



**DIPARTIMENTO DI FARMACIA**

**TESI DI DOTTORATO IN SCIENZA DEL FARMACO**

*OTTIMIZZAZIONE DEL PROFILO FARMACOCINETICO DELLA  
PALMITOILETANOLAMIDE PER APPLICAZIONE TOPICA: PROFARMACI  
DERMICI, CO-DRUGS E NANOCARRIERS LIPIDICI*

**TUTOR:**  
**Ch.<sup>ma</sup> Prof.ssa**  
**Antonia SACCHI**

**COORDINATRICE:**  
**Ch.<sup>ma</sup> Prof.ssa**  
**Maria Valeria D'AURIA**

**CANDIDATA:**  
**Dott.ssa Diana TRONINO**

# 1. Introduzione

## 1.1 La Palmitoiletanolamide

La PEA appartiene alla famiglia delle aciletanolamine, una classe di neuromodulatori lipidici relativamente recente, sintetizzata a partire da un precursore fosfolipidico di membrana (Figura 1) ed è chimicamente l'amide dell'acido palmitico,

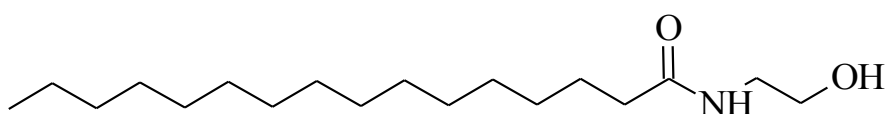


Fig.1: Struttura chimica della PEA

Venne identificata circa 60 anni fa nel tuorlo d'uovo [1] come responsabile dell'azione anti-piretica osservata in bambini con febbre reumatica, nell'olio di arachidi e nella lecitina di soia. Fisiologicamente la PEA è rilasciata in seguito a stimoli lesivi, al fine di inibire le reazioni infiammatorie o di prevenire la propagazione dello stimolo doloroso. Questo è stato dimostrato in lavori *in vitro* su diverse linee cellulari, nei leucociti [2], nei macrofagi [3], nelle cellule epidermiche di topo in seguito a vari tipi di stress [4], in modelli di lesioni cutanee di tipo infiammatorio [5] o di dolore neuropatico [6], in neuroni corticali come risposta all'aumento della concentrazione intracellulare di calcio [7] e nella corteccia cerebrale di topo in seguito ad ischemia focale [8]. Aumentati livelli di PEA sono stati inoltre riscontrati nel plasma di soggetti affetti da lombalgia in seguito a manipolazioni osteopatiche e nelle biopsie di pazienti con colite ulcerosa [6].

## ***1.2. Biosintesi e inattivazione***

La biosintesi della PEA avviene in due passaggi: (1) Il trasferimento cAMP-calcio-dipendente dell'acido palmitico dalla fosfatidilcolina (PC) alla fosfatidiletanolamide (PE), per opera della N-acil-transferasi (NAT), con formazione del N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) e in seguito (2) la formazione della PEA intracellulare dal NAPE attraverso una specifica NAPE-fosfolipasi. Al contrario di altri mediatori chimici cerebrali, le aciletanolamidi non sono prodotte e immagazzinate in vescicole secretorie per poi esser rilasciate all'occorrenza ma sintetizzate “a richiesta” (su stimolo specifico solo quando necessario) a partire da precursori fosfolipidici per azione di fosfolipasi di membrana. Portata a termine la loro funzione, sono rapidamente disattivate attraverso un meccanismo comprendente vari passaggi:

A) processo di ricaptazione che sembrerebbe mediato da un trasportatore di membrana (AMT) non ancora clonato;

B) idrolisi enzimatica ad acido palmitico e altri metaboliti da parte dell'idrolasi delle amidi degli acidi grassi (FAAH);

C) riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana.

L'enzima di membrana deputato alla degradazione della PEA ad acido palmitico ed etanolamina, FAAH (l'idrolasi delle amidi degli acidi grassi) Il punto 3 della figura 2 mostra l'inattivazione della PEA che avviene maggiormente per idrolisi operata dalla “N-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase” (NAAA), oppure attraverso la PEA Acid Amidase (PAA) per formare l'acido palmitico e l'etanolamina [9] (Figura 2).

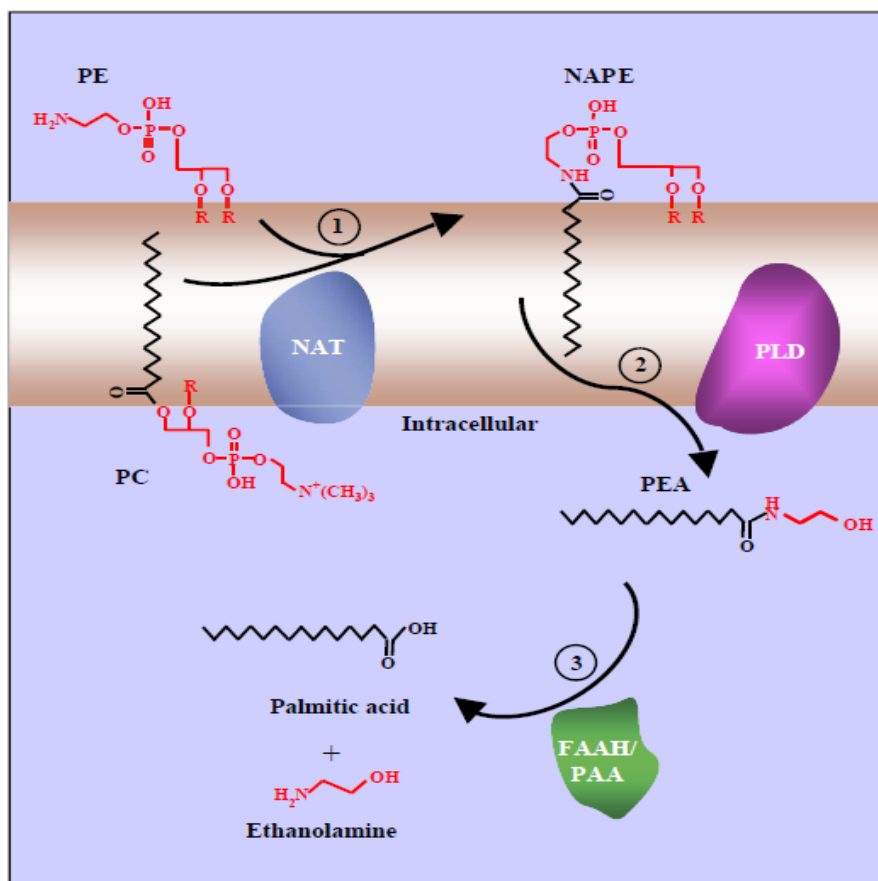
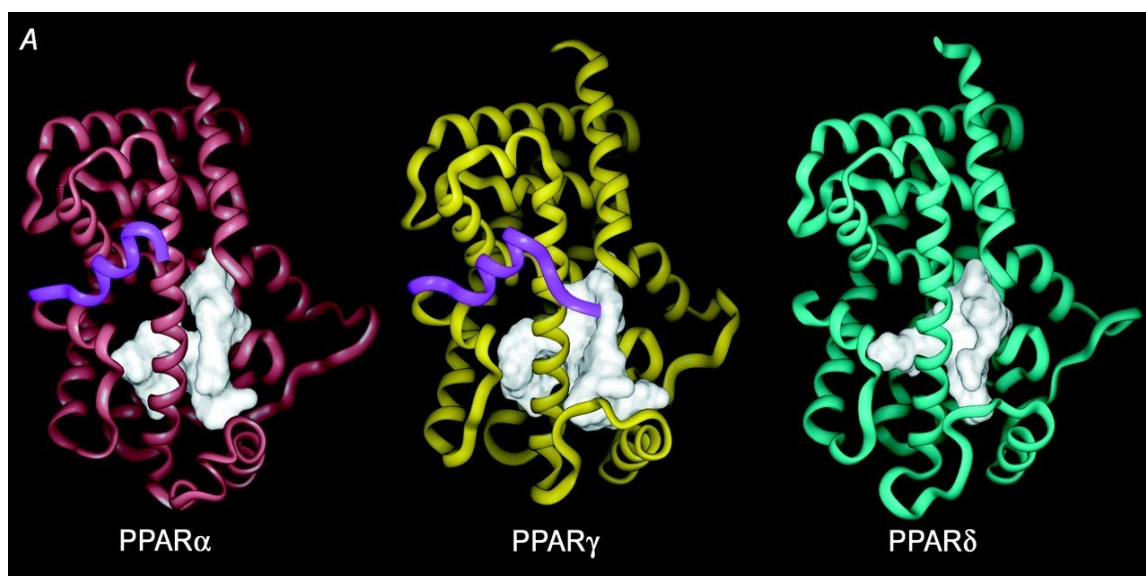


Fig. 2 - Biosintesi e inattivazione della PEA

### 1.3 Recettore attivato della proliferazione perossisomiale (PPAR- $\alpha$ )

Per quanto la letteratura sul meccanismo d'azione della PEA si sia rivolta ripetutamente verso il recettore CB2 dei cannabinoidi, solo recentemente il suo meccanismo d'azione molecolare è stato chiarito. Lo Verme nel 2005 dimostrò che la PEA era efficace negli animali CB2/ko e che i suoi effetti farmacologici sono dipendenti dal recettore attivato della proliferazione perossisomiale PPAR- $\alpha$  [10]. Questi risultati, confermati dall'inefficacia della PEA in animali PPAR- $\alpha$ /ko [11], sostengono l'ipotesi che tale sostanza sia un agonista endogeno di questo recettore.

I PPARs appartengono alla famiglia dei recettori ormonali nucleari a cui fanno parte i recettori steroidei, tiroidei e retinoici [12]. Sono stati identificati tre diversi sottotipi recettoriali del PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ) (Figura 3), le cui azioni si risolvono in una vasta e differenziata gamma di effetti biologici dipendenti dalla localizzazione tissutale e dal profilo chimico del ligando coinvolto nell'attivazione [13].



*Fig.3: Strutture tridimensionali dei sottotipi recettoriali PPAR*

In presenza del ligando, i PPAR sono in grado di legare specifiche sequenze di DNA, regolando l'espressione genica attraverso co-attivatori trascrizionali [14-16].

La PEA interagisce con questo recettore, esplicando i suoi effetti antiinfiammatori, con una potenza sovrapponibile a quelli di agonisti sintetici presenti sul mercato ed altamente selettiva, essendo la PEA incapace di attivare le isoforme recettoriali PPAR- $\beta/\delta$  o PPAR- $\gamma$  [10]

Per quanto concerne i recettori PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$ , è riportato un loro ruolo chiave nella regolazione della risposta infiammatoria, con prove sperimentali sia in vivo che in vitro [17-19].

La distribuzione tissutale del PPAR- $\alpha$  è piuttosto varia. La sua localizzazione nel SNC è stata ampiamente dimostrata, a livello cerebrale [20], spinale [11, 21] e gangliare [10, 11]. Il PPAR- $\alpha$  è espresso nel fegato, nel rene, nel cuore e nel tessuto adiposo bruno e largamente nelle cellule cutanee. I primi studi negli anni '90 hanno evidenziato la sua importanza nella regolazione dei geni coinvolti nei processi metabolici cellulari e infiammatori.

La prima indicazione di un possibile ruolo del PPAR nella modulazione dell'infiammazione si è avuta con la dimostrazione che il leucotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), un potente eicosanoide pro-infiammatorio chemiotattico, lega il recettore PPAR- $\alpha$ , attivando, mediante un meccanismo genomico, le vie della  $\omega$ - e  $\beta$ -ossidazione con la possibilità di catabolizzare lo stesso LTB<sub>4</sub>. Topi PPAR- $\alpha$  knock-out (PPAR- $\alpha$ -/-) hanno mostrato risposte infiammatorie prolungate quando stimolati con LTB<sub>4</sub> o con un suo precursore, l'acido arachidonico (AA), proprio per l'assenza di stimolazione di questi processi catabolici. Inoltre, il trattamento con sostanze in grado di legare il recettore PPAR- $\alpha$ , quali gli acidi grassi  $\omega$ -3 e il clorofibrato, ha fatto sì che si osservasse nei macrofagi e nei granulociti un incremento del catabolismo del LTB<sub>4</sub>. Si può ritenere, pertanto, che l'attivazione del PPAR- $\alpha$  contribuisca alle proprietà antinfiammatorie, antipiretiche e analgesiche di queste sostanze attraverso la stimolazione delle vie ossidative cataboliche di cui gli eicosanoidi sono substrato.

La riduzione della sintesi di molecole pro-infiammatorie, come l'IL-6 e le prostaglandine, sembra esser parte del controllo dell'infiammazione

PPAR- $\alpha$  dipendente, attraverso una ridotta attività del fattore trascrizionale nucleare kB (NF-kB).

#### ***1.4 Proprietà antiinfiammatorie cutanee della PEA***

La gran parte della letteratura riguardante le proprietà antiinfiammatorie della PEA si basa su modelli sperimentali legati ad alterazioni della fisiologia o allo sviluppo di patologie della cute e dei suoi annessi.

Nell' edema da carragenina, la PEA (10 mg/ kg/die per os), ha mostrato un abbassamento significativo dei livelli di iNOS e COX-2 , suggerendo un meccanismo genomico simile a quello dei farmaci antiinfiammatori steroidei [22]; tuttavia diversi studi hanno dimostrato che la PEA riduce l'infiammazione acuta anche in modo rapido [23], suggerendo l'esistenza di un meccanismo non genomico, come l'apertura dei canali di membrana del potassio [10], oppure l'attivazione di proteine chinasi [24]. Recentemente, in un modello murino d' infiammazione cronica delle strutture sottocutanee, è stato dimostrato che la PEA riduceva la formazione di granulomi attivamente sostenuta dalla attivazione dei mastociti [25]. Durante la formazione del granuloma vi era una significativa riduzione dei livelli di PEA nel tessuto. Al contrario, la sua somministrazione, comportava un aumento dei livelli di PEA nel tessuto interessato dal processo infiammatorio ed una riduzione della formazione di tessuto granulomatoso, 96 ore dopo lo stimolo, riducendo, anche, il numero e la degranulazione dei mastociti presenti. In seguito al controllo mastocitario anche l'angiogenesi e l'iperalgia nell'area interessata erano sensibilmente ridotte [26]. Il controllo esercitato da PEA sull'attivazione mastocitaria comporta una significativa riduzione della produzione e del

rilascio di mediatori, come il fattore di necrosi tumorale di tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) e fattori neurotrofici come il NGF [27].

I dati raccolti sulle proprietà antiinfiammatorie e analgesiche della PEA ne evidenziano la capacità di regolare questi fenomeni, soprattutto in modelli sperimentali legati a lesioni cutanee o ad alterazioni delle strutture fondamentali della cute grazie alla sua capacità di regolare la liberazione d'istamina dai granuli dei mastociti attraverso l'iperpolarizzazione da fuoriuscita di potassio, blocco dei canali del calcio, ingresso del cloro mediato dai neuro steroidi sul recettore GABA A, tutti effetti PPAR $\alpha$  dipendenti (Figura 4.)

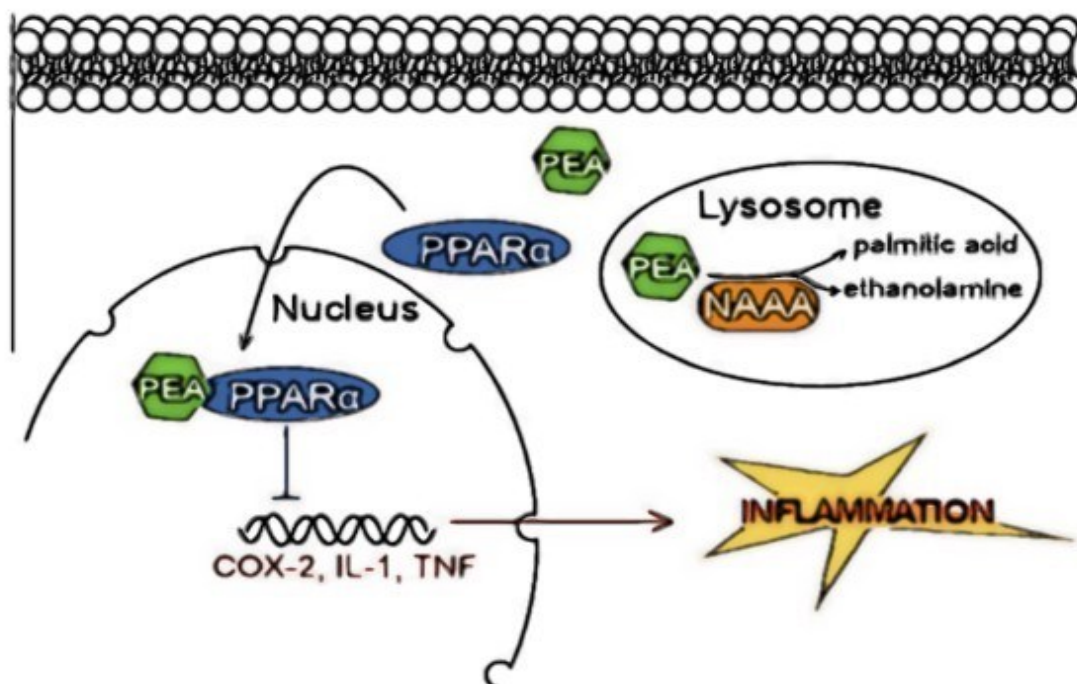


Fig. 4: Meccanismo d'azione della PEA sul recettore PPAR $\alpha$  e conseguente influenza sui fattori regolanti i processi infiammatori.



### ***1.5 Evoluzione nell'uso farmaceutico di PEA: dalla somministrazione sistemica alla via topica***

Data l'efficacia terapeutica riscontrata dalle numerose pubblicazioni scientifiche riguardanti la PEA in modelli di cute infiammata, grazie alla sua estrema sicurezza e alla presenza dei sistemi di trascrizione del segnale nelle popolazioni cellulari della cute, si è incominciato a pensare alle potenzialità terapeutiche della sua applicazione per via topica. La somministrazione topica di un principio attivo presenta il vantaggio di percorsi legislativi più snelli e meno restrittivi, rispetto alla somministrazione sistemica. Tra l'altro, se la PEA non attraversasse la cute e non fosse assorbita per via topica, potrebbe essere considerata come un attivo di natura cosmetica e rientrare in quell'ambito grigio della legislazione rappresentato dai cosmeceutici, superando le difficoltà legate ad una sua affermazione come farmaco per via sistemica. Bisogna considerare, inoltre, che la maggioranza delle patologie cutanee localizzate a componente infiammatoria (in particolare le dermatiti) sono trattate, prevalentemente mediante l'uso topico e/o sistemico di farmaci antiinfiammatori steroidei. Tali terapie, oltre che datate, sono spesso sintomatiche, prolungate nel tempo e affatto prive di effetti collaterali, tipici di questa classe di farmaci. Il vuoto relativo a terapie differenti rendeva, chiaramente, PEA un candidato ideale.

Questa candidatura è stata ulteriormente rafforzata dalla scoperta del ruolo, fondamentale, che i recettori PPAR $\alpha$  svolgono nell'omeostasi cutanea. La presenza dei recettori PPAR $\alpha$  livello cutaneo è stata dimostrata nell'epidermide e nel derma, sia di roditori che di umani [28-31], nonché in cellule cutanee residenti quali sebociti, macrofagi e linfociti T [32-34]. Per questi motivi, diversi effetti farmacologici, per applicazione topica di

modulatori dei PPAR, sono stati evidenziati nel tempo. In particolare, l'applicazione topica di agonisti PPAR $\alpha$ , ha dimostrato efficacia antiinfiammatoria in modelli murini di dermatiti topiche, sia irritanti che da contatto [35, 36]. Risulta comprovato, inoltre, come topi PPAR $\alpha$ -deficienti, mostrano una ridotta produzione di interleuchina-2 e un difetto di regolazione delle cellule T, in grado di esacerbare e prolungare la sintomatologia dovuta a dermatite allergica da contatto [37]. I PPAR $\alpha$  agonisti, inoltre, normalizzano la fisiologia cutanea, influenzando il metabolismo lipidico ed incrementando la formazione dei corpi lamellari, in modo da favorire, così, il ripristino delle funzioni barriera nella cute infiammata [38]. Il collegamento tra l'attività farmacologica di PEA e l'attivazione dei PPAR $\alpha$  è particolarmente lampante ed evidente proprio nel caso della fisiologia cutanea. Recenti ricerche dimostrano, ad esempio, che PEA perde qualsiasi effetto di natura antiinfiammatoria nel momento in cui è somministrata, topicamente, a topi geneticamente modificati e incapaci di esprimere i PPAR $\alpha$  (PPAR $\alpha$  -/-). Negli stessi modelli di infiammazione (carragenina o esteri del forbolo) la PEA dimostra spiccata efficacia antiinfiammatoria sui topi wild type [10].

Quando la PEA, inoltre, è applicata topicamente in modelli di infiammazione cutanea murina, determina riduzione drastica dell'infiammazione ed incremento nell'espressione dell'm-RNA per i PPAR $\alpha$ , comportamento tipico dei ligandi sintetici ad alta affinità per questi recettori [5, 10, 39]. Per questo motivo l'efficacia di PEA per applicazione topica è stata paragonata al Wy-14643, un agonista sintetico, risultando totalmente sovrapponibile [40]. Bisogna, inoltre, considerare che l'effetto di PEA non si limita all'attivazione dei recettori PPAR, ma si estende all'incremento della loro espressione a livello cutaneo, il che la rende una molecola ideale, considerando che è stato dimostrato come

l'espressione di questi recettori sia ridotta durante le prime fasi dell'infiammazione, indipendentemente dallo stimolo nocivo. Dopo 24h, in risposta, probabilmente, allo stimolo stesso, i PPAR risultano iper-espressi [41]. Appare evidente, quindi, che una molecola che agisca, simultaneamente, come modulatore positivo e come agonista dei PPAR $\alpha$ , rappresenta un agente terapeutico ideale per il trattamento delle patologie infiammatorie cutanee. Bisogna considerare, anche, che è dimostrato come l'applicazione topica di un agonista, garantisce azione esclusivamente locale evitando qualsiasi tipo di effetto indesiderato di natura sistemica PPAR $\alpha$  [41]. Questa è la ragione per cui PEA è stata ampiamente proposta come agente per uso topico nel trattamento di disturbi cutanei a base infiammatoria, quali dermatiti, psoriasi, prurito, sfaldamento della barriera cutanea etc., per uso sia umano che veterinario [42-45].

Il limite principale nell'impiego topico della molecola, in particolare, e degli agonisti PPAR $\alpha$ , in generale, è rappresentato dalla breve durata d'azione. A fronte di un forte effetto di riduzione del fenomeno infiammatorio, infatti, l'attività di questi modulatori è limitata alle prime ore successive all'applicazione topica. Questo determina la necessità di effettuare numerose e successive somministrazioni nell'arco della singola giornata (minimo 3 giornaliere), al fine di ottenere un effetto farmacologico rimarchevole [41-45]. Da questo punto di vista appare evidente, non potendo agire sulla farmacodinamica, la necessità di modificare la farmacocinetica della molecola al fine di determinarne un rilascio sostenuto e/o prolungato, migliorando, di conseguenza, la compliance.

### ***1.6 Somministrazione topica di attivi farmaceutici: metodi di modulazione della penetrazione cutanea.***

La cute rappresenta, senza dubbio, il più esteso tra gli organi umani, e, durante il processo evolutivo, si è specializzata in una funzione essenziale in termini di sopravvivenza: il mantenimento del tenore di idratazione dell'organismo e la funzione barriera nei confronti di xenobiotici potenzialmente nocivi [46]. Per un lunghissimo periodo, la definizione di organo è risultata eccessiva, quando associata alla pelle. Si considerava che la funzione barriera in termini letterali, ossia come un'opposizione meccanica, alla fuoriuscita di acqua e all'ingresso di sostanze esterne. La pelle, insomma, era considerata come un tessuto puramente contenitivo. Gli sviluppi della ricerca in ambito cutaneo e dermatologico, associati alla disponibilità di nuove tecniche di analisi ha permesso di scoprire l'enorme complessità strutturale di questo organo e l'esistenza di sistemi enzimatici e processi biochimici che ne regolano l'omeostasi in maniera estremamente accurata [47]. In figura 5 sono illustrate, schematicamente, le diverse strutture e strati che costituiscono la cute umana. Gli strati più esterni, in particolare lo strato corneo, sono quelli prevalentemente deputati alla funzione barriera. Diversi modelli strutturali sono stati proposti per giustificare la tenacia di questi tessuti rispetto alla penetrazione sia di sostanze idrofile che di sostanze lipofile [48, 49].

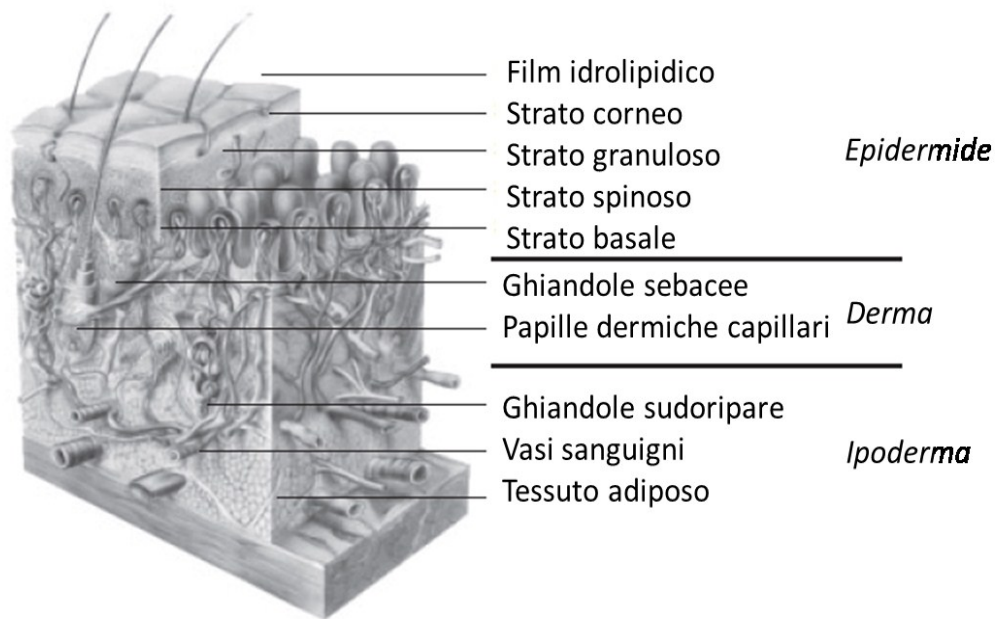


Fig. 5: Struttura schematica dell'anatomia cutanea.

Il primo modello proposto dello strato corneo è stato il modello “malta e mattoni”. I cheratinociti, in particolare dello strato corneo, anucleati, privi di attività biochimica e, morfologicamente, schiacciati, rappresentavano i mattoni, calati all'interno di una matrice lipidica extracellulare costituita, in prevalenza, da acidi grassi, ceramidi, colesterolo e colesterolo solfato [50]. In questo modello, la matrice extracellulare è organizzata in strutture lamellari in cui le interazioni tra code lipofile e teste idrofile dei componenti lipidici, creano strati adiacenti e sovrapposti. I corneociti, invece, presentano una superficie fortemente cheratinizzata, mentre contengono sostanze idrofile solitamente identificate con la denominazione di NMF (Natural Moisturizing Factor), il fattore d'idratazione naturale, costituito da soluzione acquosa di aminoacidi, acidi a catena corta, zuccheri e composti di derivazione ureidica. L'NMF costituirebbe, inoltre, la sfera d'idratazione delle teste polari dei lipidi della matrice (Figura 6).

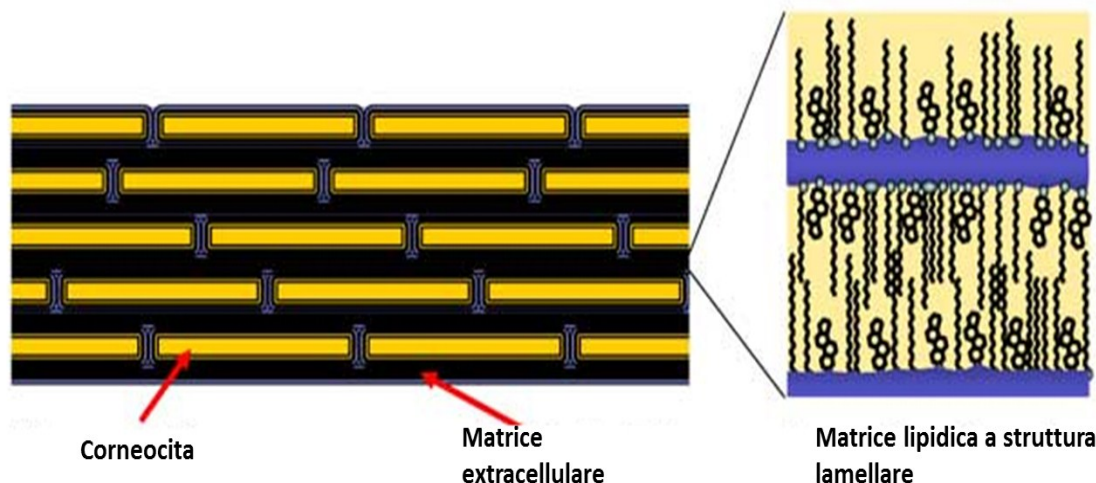
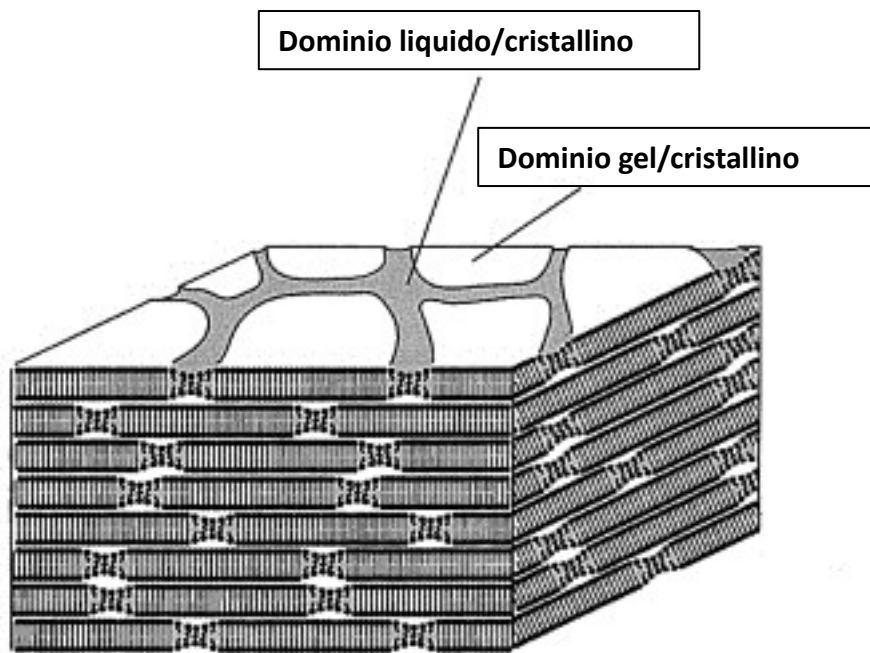


Fig. 6: Schema del modello “malta e mattoni” della cute

Una tale complessità morfologica e la conseguente alternanza tra porzioni lipofile prevalenti e strati idrofili, rappresenta una trappola ideale per le sostanze xenobiotiche, che vengono bloccate nella matrice lipidica o nelle sacche idrofile, a seconda delle proprie affinità chimico-fisiche.

Un modello più complesso, quello del mosaico fluido, è stato proposto in seguito. Le caratteristiche salienti derivano dal modello “malta e mattoni”, anche se, maggiore attenzione è rivolta allo stato fisico di aggregazione dei lipidi cutanei. La maggior parte della porzione lipidica sarebbe organizzata in un dominio gel/cristallino circondato da venature in cui la presenza di acqua e NMF comporta la transizione a una struttura liquido/cristallina. Questa struttura garantirebbe un forte effetto legame verso le molecole di acqua, regolandone, in questo modo una perdita limitata e controllata, mantenendo il corneocita idratato. Una morfologia del genere è in grado di giustificare, inoltre, le proprietà meccaniche della cute e, in particolare, le capacità elastiche e di deformazione rispetto a stimoli meccanici esterni. I contorni liquido-cristallini rappresenterebbero,

infine, i percorsi limitati e tortuosi di diffusione degli xenobiotici (Figura 7) [51].



*Fig. 7: Schema del modello a mosaico della cute*

Ulteriori modelli sono stati proposti in tempi più recenti, con un'attenzione sempre maggiore all'aspetto chimico/fisico dei costituenti cutanei e alla struttura tridimensionale. Il più recente, prevede l'esistenza di un unico coerente dominio gel/cristallino, derivante da un'unica membrana prodotta in maniera coordinata e simultanea dalle cellule degli strati cutanei più profondi. Il ripiegamento progressivo e continuo di questa membrana formerebbe la struttura tridimensionale della cute [52, 53].

Indipendentemente dal modello proposto, è ampiamente riportato in letteratura (figura 8), come le possibili vie di permeazione transcutanea siano rappresentate da:

- 1) La via transepidermica (intercellulare o transcellulare)
- 2) La via transglandulare o transfollicolare

Tra queste, la via transcellulare è la più breve e diretta, anche se la meno vantaggiosa, considerando la necessità per la molecola di dover attraversare un'alternanza di strati idro-lipofili, incontrando le già citate resistenze alla permeazione. La via intercellulare è, invece, quella maggiormente battuta dagli xenobiotici [54]. Si tratta di superare lo strato sfruttando gli spazi intercorneocitari. In questo caso, le caratteristiche chimico-fisiche delle regioni attraversate sono, pressapoco, analoghe e non si verifica l'alternanza tra porzioni estremamente lipofile ed estremamente idrofile.

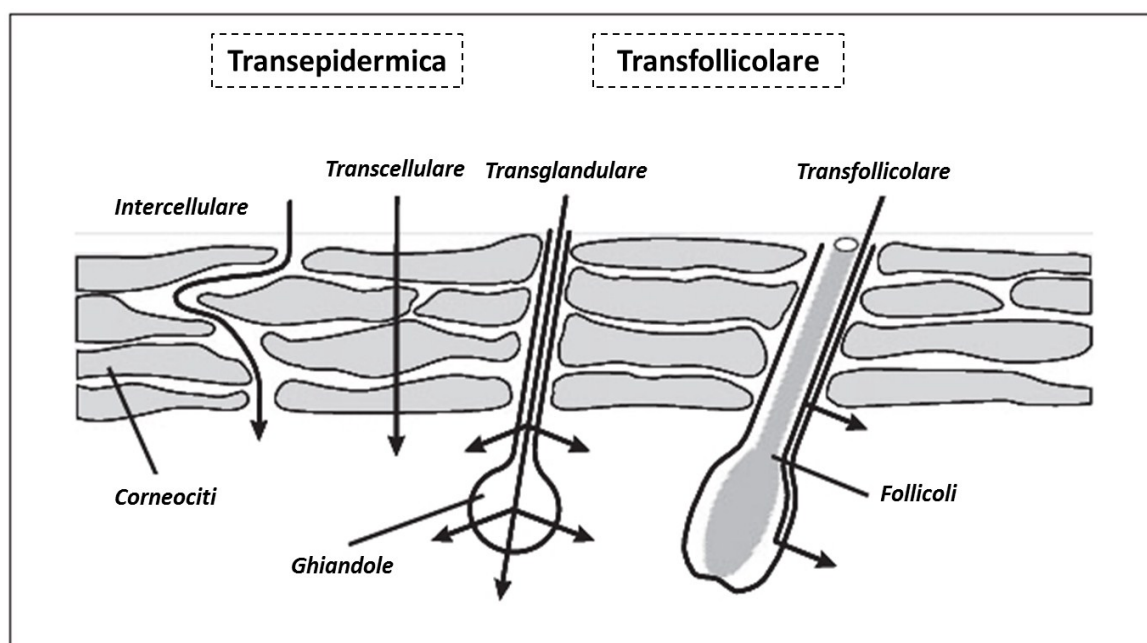


Fig. 8: Percorsi conosciuti di attraversamento cutaneo

La via transfollicolare è stata riconosciuta, per lungo tempo, come marginale nei processi di attraversamento della cute. Questo in quanto gli annessi cutanei interessati rappresentano soltanto lo 0,1% dell'intera superficie cutanea e sono, nel caso delle ghiandole sebacee e sudoripare, caratterizzati da un'intensa attività metabolica legata alla massiccia presenza di flora batterica superficiale [55]. In realtà, la via transfollicolare ha la caratteristica di essere l'unico passaggio verticale per il derma



profondo e l'ipoderma, particolarmente adatto, tra l'altro, ad alcuni tipi di formulazioni topiche, quali, ad esempio, le microparticelle [56-58].

L'applicazione topica di una sostanza farmacologicamente attiva può essere effettuata al fine di raggiungere tre differenti obiettivi:

1) La localizzazione della sostanza sulla superficie cutanea esterna al fine di garantire un effetto solo superficiale (es. disinfettanti, insetto repellenti, cosmetici decorativi e funzionali). Si parla, in questo caso, di formulazioni epidermiche

2) Il raggiungimento degli strati cutanei più profondi (quali l'epidermide metabolicamente attiva e il derma) al fine di intervenire sugli equilibri fisio/patologici cutanei. Questa sono definite formulazioni endodermiche o diadermiche e rappresentano la quasi totalità dei farmaci per via topica.

3) Il passaggio sistemico dopo attraversamento della barriera cutanea. E' l'approccio meno frequente, più complesso e limitato ad alcune specifiche molecole, recanti altrettante specifiche proprietà chimico-fisiche (es. nitroglicerina). Si tratta, in questi casi, di formulazioni transdermiche.

In tutti e tre i casi citati, la permeazione del farmaco, tal quale, è spesso difficoltosa e il profilo farmacocinetico poco favorevole. In alcuni casi è difficile raggiungere il tessuto bersaglio, in altri si verificano fenomeni di accumulo, in altri ancora si ottengono soltanto reazioni locali. La farmacocinetica di una molecola somministrata per via cutanea è la sommatoria di una serie di fattori spesso contrastanti tra loro, rappresentati dalla fisiopatologia cutanea, dalle caratteristiche del farmaco (bilancio idro-lipofilo, dimensioni molecolari, dimensioni delle particelle, capacità di legame alle proteine) e dalle caratteristiche della formulazione (reologia, composizione del veicolo, tipologia di eccipienti).

Nel tempo, diverse strategie sono state studiate per ottimizzare il profilo farmacocinetico di un farmaco per applicazione topica. Queste strategie possono essere suddivise in due grandi gruppi: le strategie chimiche, che prevedono espedienti formulativi o modifiche sintetiche della molecola di partenza, e le strategie fisiche, che prevedono l'impiego di tecniche elettromagnetiche atte a superare la resistenza cutanea all'attraversamento.

### ***1.7 Gli enhancer di penetrazione cutanea***

Si definisce enhancer di penetrazione cutanea una sostanza in grado di incrementare la permeabilità cutanea agli xenobiotici. L'impiego degli enhancer nelle formulazioni topiche ha, ovviamente, lo scopo di promuovere il trasporto del farmaco attraverso la barriera cutanea. A questo gruppo di sostanze appartengono una serie numerosissima di composti (Figura 9), spesso completamente differenti tra di loro dal punto di vista delle caratteristiche chimico-fisiche, il che lascia preludere all'esistenza di meccanismi di azione multipli e, spesso, non ancora perfettamente identificati [59].

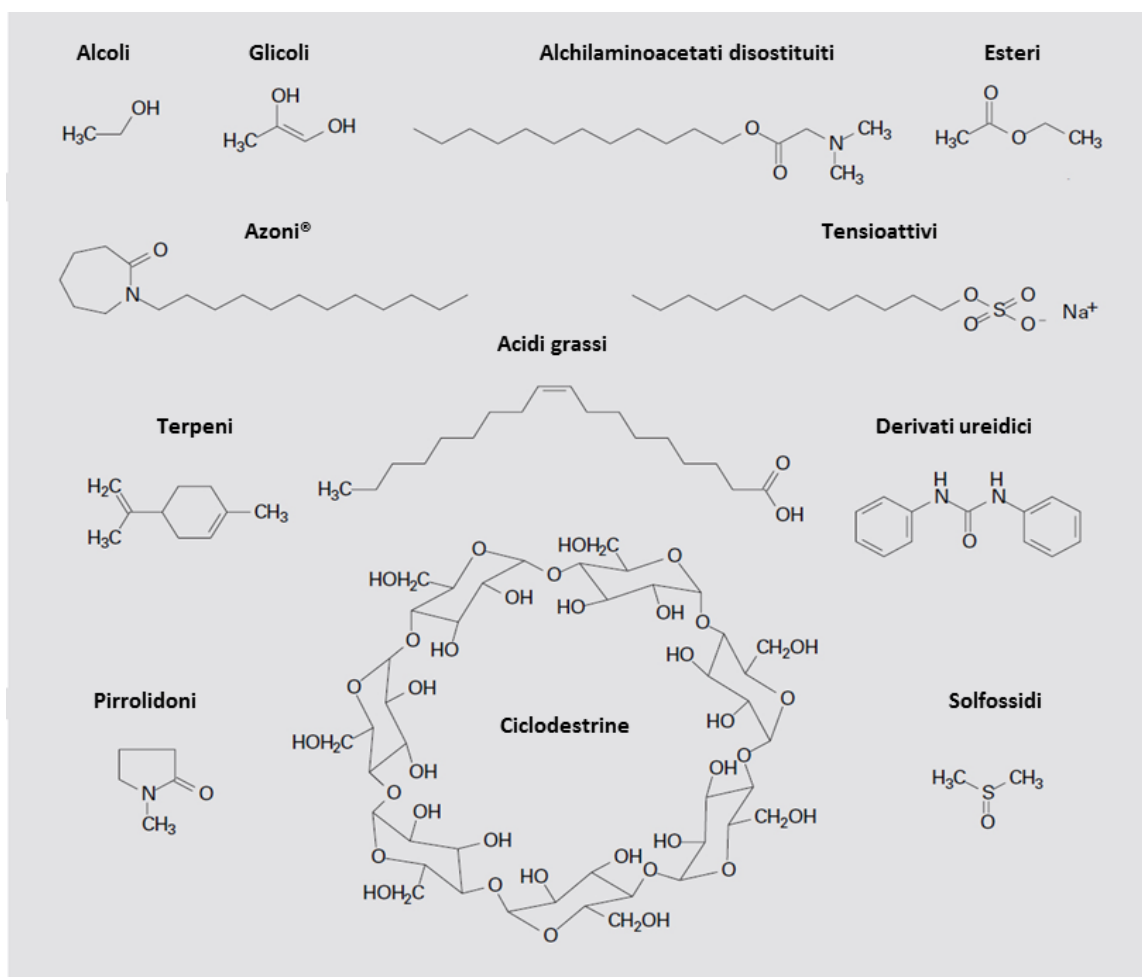


Fig. 9: Principali classi chimiche di enhancer di penetrazione cutanea

Si ritiene che il meccanismo d'azione degli enhancer più idrofili sia rappresentato dall'interazione con le teste polari dei lipidi cutanei. La conseguenza immediata è l'alterazione della struttura impacchettata (Figura 5), una maggiore quantità di acqua libera e la diffusione facilitata delle sostanze di natura idrofila [60].

Che l'incremento di spessore delle sezioni idrofile della cute, favorisca il passaggio di molecole idrofile è confermato dal fatto che, occludendo una regione cutanea e impedendo la normale perdita di acqua transepidermica, la funzione barriera ne risulta temporaneamente

compromessa. E' su queste basi che funzionano enhancer di penetrazione quali ad esempio i derivati ureidici. L'igroscopia di queste molecole, determina un aumento dei livelli cutanei di acqua dal, canonico 5-10%, fino al 30-40%, con conseguente aumento di diffusione delle sostanze idrofile [61, 62] .

Una possibilità differente deriva dall'impiego di enhancer di natura lipofila, in grado di interagire con le catene carboniose dei lipidi cutanei, alterandone la fluidità e creando dei cammini preferenziali per sostanze di natura idrofobica [63].

Spesso gli enhancer sono in grado di migliorare l'assorbimento cutaneo, attraverso un incremento di solubilità del farmaco (es. ciclodestrine), attraverso un intervento sul suo coefficiente di partizione (cute/veicolo) [47, 64].

Gli enhancer di penetrazione "drastici" sono, infine, principalmente solventi (alcoli e solfossidi) che alterano fisicamente la funzione barriera cutanea attraverso un'estrazione profonda dei lipidi cutanei medesimi. E' evidente come questo meccanismo è, nella maggior parte dei casi, sconsigliato per sostanze adoperate nel trattamento di stati patologici cutanei [65].

### ***1.8 I nanocarrier lipidici come sistemi di veicolazione di attivi per via topica***

Negli ultimi vent'anni l'interesse verso i sistemi nanoparticellari a matrice lipidica è divenuto sempre maggiore in virtù del fatto che essi

rappresentano sistemi a rilascio di ampia applicazione in ambito farmaceutico e cosmetico. I sistemi nanoparticellari alternativi di natura lipidica, i “Solid Lipid Nanoparticles” (SLN), iniziano a svilupparsi agli inizi degli anni '90, in quel filone di ricerca rappresentato dalle micro e nanoformulazioni [66].

Diversi tipi di SLN e, soprattutto differenti tipi di applicazioni sono state sviluppate in quel periodo, anche se, al di là dell'importanza scientifica delle ricerche svolte, nessun risvolto di natura applicativa è mai stato ottenuto. Le SLN presentavano una serie di problemi evidenti rappresentati da:

- Ridotto limite di carico. Era complicato, se non impossibile, raggiungere una concentrazione interna di farmaco che fosse poi in grado di garantire efficacia terapeutica.
- Ridotta stabilità chimico-fisica. I sistemi nanoparticellari ideati erano, spesso, tecnologicamente perfetti, ma presentavano grandi problemi di stabilità che ne annullavano le possibilità applicative.
- Scarsa capacità di localizzazione dell'azione e, conseguente, scarso drug targeting. Le SLN presentavano enormi capacità di veicolazione di attivi attraverso le membrane biologiche. Alle volte questo aspetto, in teoria positivo, diventava un limite, data l'impossibilità di localizzare l'attività della molecola in un particolare distretto anatomico, escludendone altri.
- Limitate caratteristiche di rilascio controllato. Molte delle SLN proposte avevano il problema di rilasciare l'attivo in modo eccessivamente rapido o lento, annullando, di fatto le possibilità di rilascio controllato, che erano considerate uno dei punti di forza nell'impiego di formulazioni nanoparticellari.

- Scadente profilo tossicologico. La maggioranza delle SLN proposte (spesso formulate attraverso l'impiego di metalli, siliconi, sostanze silicee etc.) presentavano sfavorevole profilo tossicologico che ne determinava, di fatto, l'esclusione dall'ambito farmaceutico.

Un'evoluzione naturale delle SLN è rappresentata dalle NLC (nanostructured lipid carrier) le quali hanno consentito una rinascita forte d'interesse verso le formulazioni nanoparticellari. Nella maggioranza delle NLC, i problemi riscontrati per le SLN sono, brillantemente, superati. Soprattutto i dubbi, relativi alla potenziale tossicità di questi sistemi, sono stati dissipati. La maggiore critica rivolta alle SLN era rappresentata dal fatto che, particelle di dimensioni ridotte (da 1 a 100 nm), rappresentano un fattore di rischio tossicologico, giacché tendono a essere internalizzate nelle cellule o aderire alle membrane cellulari causandone degradazione e rilascio di prodotti citotossici. Queste considerazioni, che potevano rappresentare delle interdizioni all'uso delle NLC sono in gran parte arginate dal fatto che esse sono formulate in presenza di lipidi biodegradabili, i cui prodotti di degradazione sono acidi grassi e glicerolo, comuni costituenti del corpo umano. Difatti le NLC esibiscono un'eccellente tollerabilità [67]. Inoltre, rispetto alle SLN, il contenuto d'acqua si riduce notevolmente e ciò comporta un miglioramento nella fase di conservazione, siccome l'acqua richiama carica microbica. Minor contenuto d'acqua si traduce anche in minor quantitativo di conservante adoperato e migliore tollerabilità della formulazione. Grazie all'architettura solida della matrice delle NLC, inoltre, gli scambi dinamici sono bloccati: i principi attivi vengono imprigionati e stabilizzati. La degradazione causata dall'acqua e l'ossigeno viene contrastata lasciando i principi attivi integri, fino al contatto con la biofase.

L'interesse suscitato dai veicoli a matrice lipidica è dovuto all'ampia applicabilità in ambito orale, parenterale, oculare, polmonare e dermico [66]. Quest'ultimo è stato il settore più studiato per l'utilizzo delle NLC.

L'evoluzione di questi sistemi nanoparticellari incomincia intorno al 2005, quando si fa strada l'idea che il core del veicolo dovesse essere solido per preservare la stabilità dell'attivo e permetterne un rilascio graduale. Nasce la prima generazione di Nanocristalli: la tecnologia SLN, "Solid-Lipid-Nanocrystals", nano-cristalli con lipidi solidi. La struttura all'interno del veicolante è perfetta. E' assimilabile a mattoni composti di oli solidi, disposti in modo da lasciare poco spazio alle sostanze funzionali. La seconda generazione di nano-cristalli segna l'inizio di una nuova era: con una tecnologia di produzione innovativa, è lanciata la tecnologia NLC, "Nanostructured-Lipid-Carriers", veicolanti lipidici nano-strutturati. La particolarità delle strutture NLC risiede nel fatto che l'interno delle vescicole è composto di cristalli imperfetti di lipidi solidi che lasciano tanto spazio per inserire le sostanze funzionali in quantità mai ottenute prima (Figura 10). Le strutture NLC rimangono inoltre solide a temperatura corporea; applicate sulla pelle, non si sciolgono immediatamente, permettendo un rilascio graduale delle sostanze attive, oltre a rafforzare la funzione barriera della pelle con un film protettivo non grasso. Le NLC sono veicoli costituiti da una fase lipidica solida a temperatura ambiente e una fase acquosa di tensioattivo.

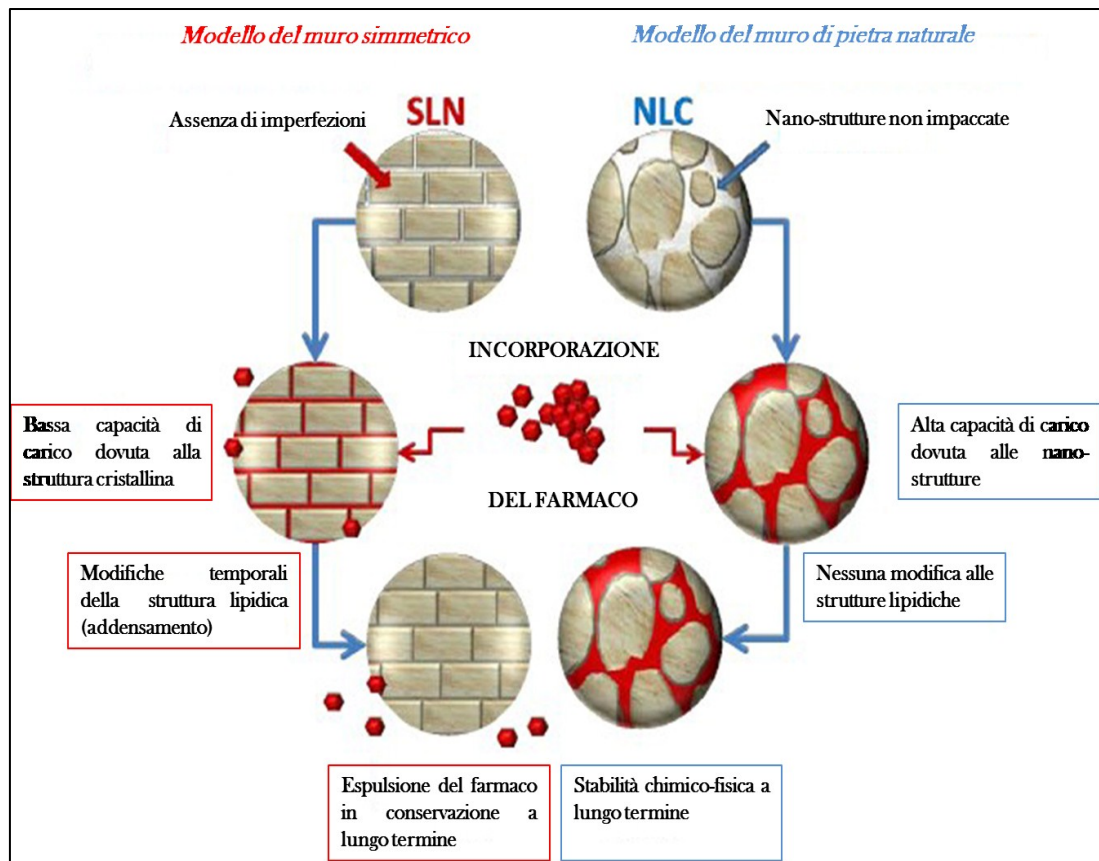


Fig. 10: Differenze schematiche tra SLN e NLC

Le particelle sono ottenute miscelando un lipide solido al lipide liquido in un rapporto variabile da 70: 30 fino a 99.9: 0.1 [67]. La presenza del lipide liquido determina un abbassamento della temperatura di fusione del lipide solido. Il contenuto totale di lipidi può attestarsi fino al 95%. L'attivo può localizzarsi tra le catene di acidi grassi, tra gli strati di lipidi o tra i cristalli della matrice lipidica. Esistono tre diverse strutture di NLC [66]:

- 1) tipo imperfetto
- 2) tipo amorfo
- 3) tipo multiplo



Il tipo "imperfetto" è caratterizzato da miscele di lipidi dimensionalmente differenti e spazialmente disordinate.

Nel tipo "amorfo" la matrice lipidica solida non è cristallina. La mancanza di cristallinità si raggiunge miscelando particolari tipi di lipidi. Il tipo "multiplo" è paragonabile, strutturalmente a un'emulsione W/O/W essendo presente un olio, disperso in un lipide solido, che a sua volta si trova in una dispersione acquosa. La matrice lipidica contiene minuscoli nanocompartimenti oleosi: ciò consente di solubilizzare quegli attivi per i quali la solubilità in olio è superiore rispetto alla solubilità nel lipide solido. Ad una bassa concentrazione dell'olio, le molecole sono distribuite insieme alla matrice lipidica solida (non si formano nanocompartimenti oleosi). All'aumentare della concentrazione dell'olio avviene la separazione delle fasi e si formano i nanocompartimenti oleosi (Figura 11).

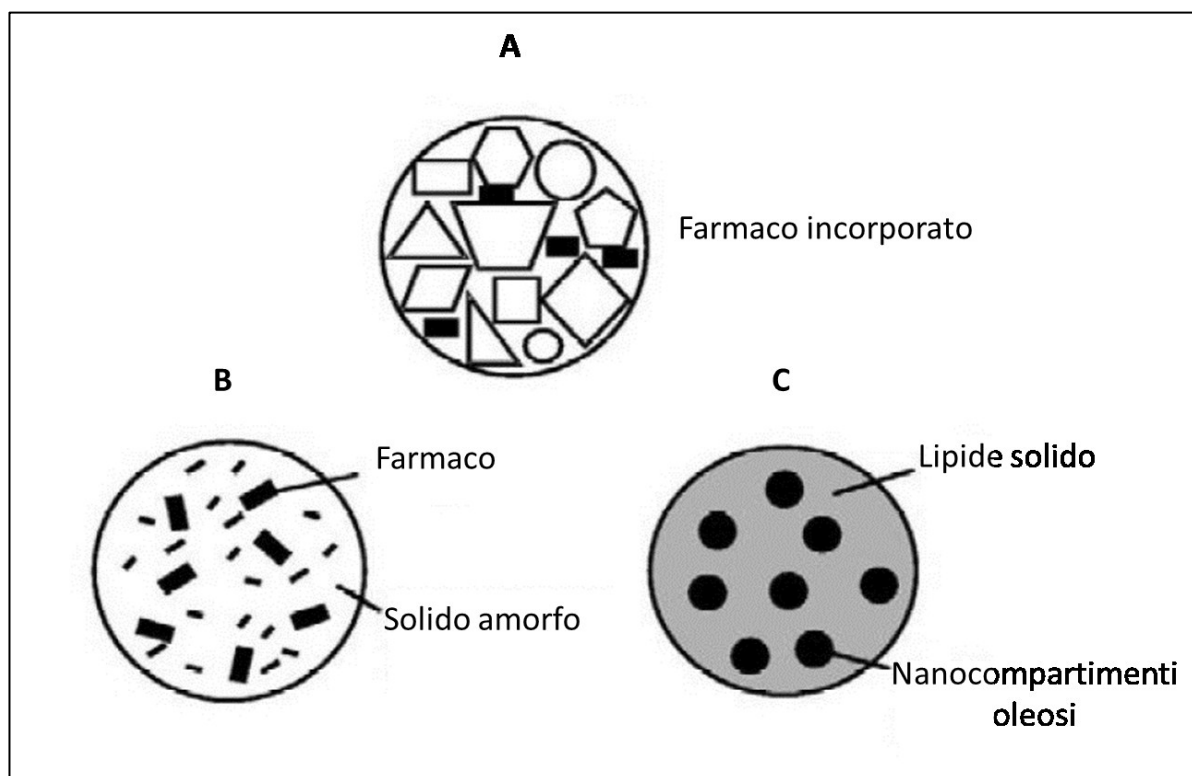


Fig. 11: I tre tipi di NLC: imperfette (A), amorse (B) e multiple (C)

Per queste NLC si parla, spesso, di NLC di tipo multiplo O/F/W (olio in lipide solido in acqua). Esse sono particolarmente adoperate per la veicolazione dermica di farmaci ed attivi cosmetici. La matrice lipidica, infatti, come già detto in precedenza, protegge l'attivo dalla decomposizione e da processi di ossidazione. L'architettura della matrice lipidica a cristalli imperfetti è, inoltre, responsabile dell'instaurarsi di fenomeni di rilascio controllato. Infatti, quando le nanoparticelle vengono applicate sulla cute, i cristalli lipidici vanno incontro lentamente e gradualmente a transizione di fase, che consente, in definitiva, la liberazione del principio attivo in esse contenuto. Di conseguenza l'assenza di *burst effect*, tipico invece delle SLN, rende ragione della scarsa tossicità sistemica. Questo è uno dei principali vantaggi delle NLC rispetto alle SLN.

In letteratura è documentato, inoltre, un effetto “ enhancer” probabilmente dovuto alle variabili formulative introdotte durante la preparazione [68].

La nano-dimensione rappresenta, infine, un approccio formulativo ideale per la somministrazione topica di attivi, giacché, le dimensioni ridotte, favoriscono proprietà adesive verso la superficie cutanea, favorendo la formazione di un film occlusivo. L'adesione superficiale è già di per se un sistema ideale per un rilascio controllato e sostenuto di attivi, ma , nel caso della cute, è ulteriormente importante se consideriamo quanto detto nel precedente paragrafo, ossia che il trattamento della cute in condizioni occlusive è ragione di una sua maggiore permeabilità.

### ***1.9 I profarmaci dermici: significato farmaceutico e sviluppi applicativi***

Si definisce, classicamente, un profarmaco una versione, chimicamente modificata, di una sostanza farmacologicamente attiva, che subisce una trasformazione, *in vivo*, al fine di rilasciare la forma attiva. La strategia di sintesi dei profarmaci è, attualmente, una delle maggiormente adoperate quando, in presenza di una molecola caratterizzata da un notevole e favorevole profilo farmacodinamico, risultino invece sfavorevoli le proprietà chimico-fisiche, biofarmaceutiche e, soprattutto farmacocinetiche [69-74]. Un profarmaco garantisce, ad esempio, la possibilità di superare diversi ostacoli alla formulazione ed al rilascio di farmaci, quali, ad esempio, scarso o limitante profilo di solubilità, insufficiente assorbimento orale, instabilità chimica, rapido metabolismo presistemico, insufficiente targeting sul sito d'azione, tossicità ed irritazione locale. Nella maggioranza dei casi i profarmaci sono assimilabili a semplici derivati della molecola d'origine che richiedono una, massimo due, trasformazioni enzimatiche e/o chimiche per liberarla e favorirne l'attività terapeutica.

L'importanza dei profarmaci in ambito farmaceutico è sancita da una serie di dati impressionanti, relativi agli studi compiuti ed ai successi conseguiti, soprattutto dal punto di vista industriale. Già nel 1977 la Roche pubblica un volume nel quale, i principi fondamentali delle strategie fisiche, chimiche e biochimiche da adottare nella progettazione di profarmaci erano ampiamente trattate. Da circa un decennio si faceva strada, in ambito industriale, il concetto di modifica chimica transiente di molecole di acclarata efficacia, al fine di ottimizzarne aspetti poco vantaggiosi nell'applicazione terapeutica [75]. Il vantaggio, per le industrie

farmaceutiche, era rappresentato, innanzitutto, dal fatto che i profarmaci sono meno costosi da sviluppare ed immettere in commercio rispetto ai farmaci. Non richiedono, infatti, verifiche approfondite dal punto di vista farmacodinamico, e non rappresentano, come gli analoghi, delle nuove entità chimiche, con le problematiche che ne derivano dal punto di vista tossicologico. Il profarmaco può essere adoperato, inoltre, vantaggiosamente sul mercato, all'atto della scadenza dei brevetti a copertura delle molecole d'origine, prolungandone di fatto, il periodo di esclusiva da parte delle aziende produttrici. Per quanto la pubblicazione citata, rappresenta una pietra miliare nel processo di sviluppo e di commercializzazione dei profarmaci, all'epoca le potenzialità di questa strategia erano ancora abbastanza inesprese, soprattutto a causa dell'assenza di conoscenza riguardo a molti processi di natura biochimica che consentono, ad oggi, la possibilità di progettare, in maniera sempre più sofisticata, profarmaci in grado di incrementare notevolmente l'efficacia delle molecole d'origine. Attualmente il 5-7% dei farmaci in commercio possono essere classificati come profarmaci, e, si calcola che, a partire dal 2001, circa il 15% dei nuovi farmaci introdotti in commercio, annualmente, siano stati profarmaci [70].

La sofisticazione nella progettazione di tali molecole, ha comportato l'introduzione di nuovi concetti applicativi, rappresentati dai profarmaci bioprecursori, i soft drug ed i co-drug. I primi sono rappresentati da molecole prive di attività biologica e, anche, di gruppi carrier o di derivatizzazione. La trasformazione della molecola in forma attiva passa per una serie di modifiche metaboliche, effettuabili solo a contatto con la biofase, che comportano modificazioni strutturali tali da consentire l'attività farmacologica. Dal punto di vista strategico è un po' come sfruttare il metabolismo a proprio vantaggio, facendo in modo che il

prodotto finale di un processo di metabolizzazione sia una forma attiva piuttosto che una forma inattiva, come accade di solito [76].

Si definiscono, invece, *soft-drug* quelle molecole, farmacologicamente attive, che vanno incontro ad un processo di inattivazione metabolica, predicibile e controllata, non appena abbiano esplicato la propria attività [77]. E' chiaro che sia i *soft-drug* sia i bioprecursori richiedono una forte conoscenza della metabolomica e sono, più facilmente, soggetti a fallimento, considerate le enormi variabili biologiche da considerare all'atto della progettazione.

Molto più vicini al concetto di profarmaco, benché ne rappresentino una fruttuosa evoluzione, sono i *co-drug*. In questo caso, la molecola è costituita da due differenti gruppi, entrambi farmacologicamente attivi, in grado di esercitare, reciprocamente, un effetto promotore di attività. Un *co-drug* può essere progettato sulla base di meccanismi d'azione sinergici, sia su base farmacodinamica che biofarmaceutica, tra le due molecole selezionate. Si ottiene un *co-drug* ideale quando una delle due entità molecolari, oltre ad esercitare attività farmacologica a concentrazioni analoghe alla controparte, riesce a svolgere, anche, il ruolo di promotore di assorbimento [78-80].

Resta inteso che affinché un profarmaco o un *co-drug* possano funzionare, il legame tra le due molecole costituenti debba essere sufficientemente labile all'azione di enzimi idrolitici e/o alla semplice idrolisi chimica, una volta a contatto con l'ambiente biologico. Diversi tipi di legami sono stati studiati e proposti per favorire il rilascio dei farmaci dai precursori inattivati e, tra questi, vi sono esteri, esteri fosforici, tioesteri, carbonati, carbammati, amidi, ossime e basi di Mannich.

Gli esteri rappresentano, in ogni caso, il più diffuso tipo di molecole in quest'ambito. Le ragioni sono molteplici:

- maggiore semplicità e minore costo per il processo chimico-sintetico
- maggiore labilità chimico/enzimatica della funzione estere rispetto alle altre citate
- numero elevato di isoforme per gli enzimi idrolitici preposti alla scissione del legame (carbossiesterasi, acetilcolinesterasi, butirrilcolinesterasi, arilesterasi etc.)
- distribuzione ubiquitaria delle esterasi nell'organismo e presenza in tessuti dove altri enzimi idrolitici sono scarsamente rappresentati (ad esempio la cute).

Per questi motivi, gli esteri rappresentano il 49% del totale dei profarmaci attualmente in commercio [69].

Molto diffuso è l'uso di profarmaci soprattutto per applicazione topica. In quest'ambito, il primo e più importante impiego è rappresentato dall'incremento dell'assorbimento successivo alla somministrazione topica. Accade spesso, infatti, che l'assorbimento del farmaco sia scarso a causa delle proprietà chimico-fisiche intrinseche della molecola, che lo rendono poco solubile e/o poco incline all'attraversamento delle membrane. Spesso le funzioni chimiche responsabili delle scarse proprietà farmacocinetiche sono gli stessi gruppi farmacoforici che determinano la potenza e l'efficacia della molecola. Modificarle significherebbe perdere le prerogative farmacodinamiche, mentre il mascheramento garantito dal profarmaco rappresenta una strategia ottimale. In questo caso lo scopo della derivatizzazione è di modificare ed ottimizzare le interazioni farmaco/membrana. L'azione del profarmaco può essere, inoltre, quella di alterare la farmacocinetica dal punto di vista della durata d'azione. In

pratica, modulando la promoiety, adoperata per derivatizzare la molecola di origine, è possibile rallentare i processi metabolici di idrolisi, favorire la localizzazione del farmaco in specifiche aree, rallentare la metabolizzazione e/o l'escrezione. Il risultato è di prolungare l'attività, rallentare l'insorgenza d'azione e/o aumentare l'efficacia per aumento di concentrazione nei pressi del sito d'azione.

Un gruppo di molecole ampiamente studiate come promoiety in ambito di profarmaci dermici è rappresentato dai polietilenglicoli (PEG). Tali molecole sono caratterizzate, chimicamente, dalla sequenza di un numero variabile di unità ossietileniche con due gruppi ossidrilici terminali. Si tratta di promotori di assorbimento cutaneo, la cui efficienza è dovuta alla capacità di esercitare, simultaneamente, diverse prerogative, precedentemente descritte per gli altri enhancer. Più nello specifico, i PEG mantengono, data la loro struttura chimica, natura anfifilica, con la possibilità di interagire sia con le code lipofile che con le teste idrofile dei lipidi cutanei, favorendo, di conseguenza, la penetrazione sia di sostanze idrofile che di sostanze lipofile. La notevole flessibilità strutturale e conformazionale, consente loro di interporsi facilmente all'interfaccia tra una fase idrofobica ed una idrofila, e, a differenza dei surfattanti, con cui condividono le proprietà anfiprotiche, sono molto meglio tollerati a livello cutaneo. Sono in grado, inoltre, per motivi analoghi, di incrementare la solubilità di composti poco solubili e, favorirne la ripartizione veicolo/cute. Quando il numero di unità poliossietileniche supera le 50, altre proprietà iniziano a palesarsi. I PEG incominciano ad organizzarsi in strutture micellari anche a basse concentrazioni e, la funzione veicolo incomincia ad essere esercitata attraverso l'inclusione del principio attivo all'interno della struttura micellare, in maniera simile alle ciclodestrine [81, 82].

L'ottima capacità di incrementare la permeazione cutanea, il favorevole profilo tossicologico e la reattività delle estremità ossidriliche, ha consentito, per i PEG un impiego totalmente diverso rispetto ai classici enhancer di penetrazione. I PEG sono stati usati come gruppi di derivatizzazione di molecole farmacologicamente attive per l'ottenimento di profarmaci dermici [83-85]. Gli esteri così ottenuti subiscono una modifica delle proprietà chimico-fisiche della molecola di partenza tale da favorirne l'attraversamento della barriera cutanea, tramite i meccanismi già citati. Il vantaggio è dato dalla selettività nell'azione di promotori di assorbimento. Uno dei limiti degli enhancer di penetrazione, PEG inclusi, è rappresentato, infatti, dalla necessità di impiego a concentrazioni piuttosto elevate, come componenti della formulazione topica. In questo modo si favorisce, l'incremento di permeazione di, pressoché, tutti gli altri ingredienti presenti, oltre che della molecola farmacologicamente attiva. L'alterazione delle proprietà barriera della cute, inoltre, per quanto transiente, implica maggiore possibilità di permeazione per qualsiasi xenobiotico. Quando il promotore di assorbimento è, invece, direttamente legato alla molecola, le quantità adoperate corrispondono alla dose di farmaco somministrata, le funzioni barriera sono preservate meglio e l'incremento di permeazione è realizzato, esclusivamente, nei confronti del farmaco. La possibilità che i PEG si leghino ad un attivo cutaneo mediante legame estere è, infine, un vantaggio ulteriore nell'impiego di questa strategia.



## 2. Obiettivi del lavoro

Considerando la documentata efficacia della PEA per applicazione dermica, e, allo stesso tempo, il suo scarso profilo farmacocinetico, l'obiettivo di questo lavoro di ricerca è stato incentrato sulla progettazione e realizzazione di strategie che mirassero all'ottimizzazione della farmacocinetica della molecola per applicazione cutanea.

La prima strategia adoperata è stata quella dei profarmaci dermici. In particolare, una mini-libreria di composti è stata realizzata adoperando i PEG come gruppi di derivatizzazione. Data l'assenza, sulla molecola d'origine, di un gruppo direttamente esterificabile, la strategia sintetica ha previsto la formazione di intermedi, mediante legame con diversi spaziatori acidi bidentati, i quali sono stati, successivamente, fatti reagire con l'opportuno PEG. In questo modo è stato effettuato uno studio sistematico che consentisse di investigare la ricaduta farmacocinetica di tre diverse prerogative strutturali dei profarmaci:

- la lunghezza della catena pegilata
- la lunghezza e la rigidità dello spaziatore bidentato
- la presenza di un ossidrile libero all'estremità del raggruppamento poliossietilenico

Come gruppi spaziatori sono stati investigati il succinato, il maleato, lo ftalato ed il carbonato. I PEG utilizzati, invece, sono stati il di, tri e tetraetilenglicole. La modifica sull'ossidrile terminale del dietilenglicole è stata effettuata, invece, tramite metilazione diretta (Figura 12).

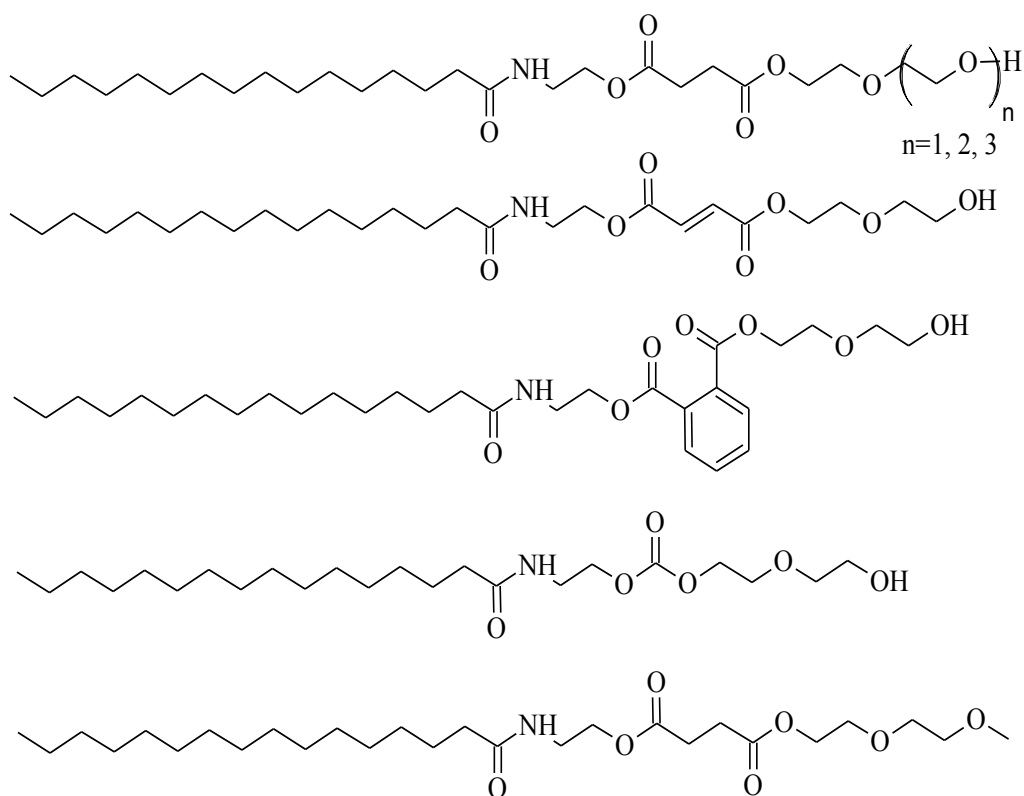


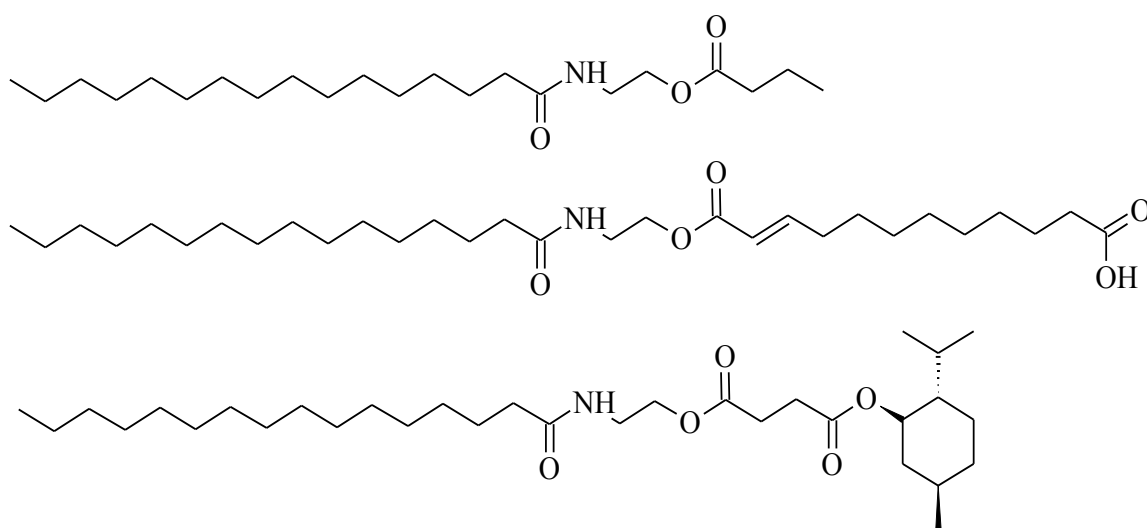
Fig. 12: Strutture chimiche dei profarmaci sintetizzati

I profarmaci sintetizzati sono stati, quindi, valutati dal punto di vista dell'accumulo cutaneo, dell'efficacia farmacologica e del metabolismo chimico ed enzimatico.

L'accumulo cutaneo è stato determinato in esperimenti *ex vivo* su cute murina. Un modello murino di infiammazione e iperalgesia è stato adoperato per la determinazione dell'efficacia dopo applicazione topica. Questi saggi sono stati effettuati in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Antonio Calignano, presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università degli studi di Napoli Federico II. La stabilità chimica dei profarmaci è stata valutata in soluzioni acquose tamponate (pH 5.5), mediante l'uso di surfattanti in qualità di cosolventi. La scarsa solubilità dei derivati in ambiente acquoso ha determinato l'impossibilità all'impiego di metodi *in vitro* di idrolisi enzimatica, mediante l'uso di esterasi di origine

animale. Sono stati, quindi, adoperati metodi computazionali atti ad individuare l'affinità dei profarmaci verso le Carbossiesterasi II, mediante metodi di docking. Gli studi di docking sono stati condotti in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Giulio Vistoli del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Milano.

La seconda strategia adottata è stata quella della sintesi di co-drug della PEA. In questo caso, la molecola è stata esterificata mediante l'uso dell'acido butirrico, dell'acido traumatico e del mentolo (Figura 13).



*Fig. 13: Strutture chimiche dei co-drug sintetizzati*

Il razionale nell'impiego di queste molecole nella progettazione dei co-drug, deriva dal fatto che l'acido butirrico e l'acido traumatico sono molecole per le quali è stata ipotizzata una funzione di natura cicatrizzante [86-88]. L'associazione di questa attività cicatrizzante con la capacità della PEA di intervenire sui mediatori dell'infiammazione, favorendo il processo di riparazione tissutale ne farebbe potenziali co-drug con azione

cicatrizzante. La struttura di esteri a lunga catena potrebbe garantire, inoltre, un effetto di maggiore permeazione a livello cutaneo. Nel caso del mentolo, invece, il razionale è rappresentato dal fatto che, l'azione sui recettori TRPM8 e, parzialmente, sui TRPV1, è in grado di determinare effetto analgesico successivamente ad applicazione topica. Al di là di questo potenziale effetto sinergico, il mentolo, così la maggior parte dei terpeni di origine naturale, svolge un ruolo di enhancer di penetrazione cutanea, il che lo rende un candidato ideale, come controparte della PEA, nella struttura di un co-drug [89-91]. I co-drug sintetizzati sono stati valutati, per la loro efficacia farmacologica mediante studi su modelli cellulari di wound healing e modelli murini di analgesia meccanica e infiammazione, in collaborazione con il già citato gruppo di ricerca del Prof. Antonio Calignano.

L'ultima parte di questo lavoro di ricerca è stata, invece, dedicata alla formulazione di NLC contenenti PEA per applicazione topica. Uno studio sistematico, effettuato in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Francesco Bonina, del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli studi di Catania, è stato effettuato per individuare i componenti ideali per la formulazione delle NLC, in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della PEA. Una volta formulate le NLC sono state caratterizzate mediante studi di calorimetria differenziale, valutazione del potenziale  $\zeta$  e studi microscopici di morfologia, in collaborazione con il Dott. Paolo Blasi del Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco dell'Università degli studi di Perugia. Successivamente il profilo di permeazione cutanea delle NLC è stato valutato mediante saggi di permeazione *in vitro*, adoperando celle a diffusione verticale tipo Franz. L'efficacia farmacologica è stata, infine, verificata mediante modelli animali di infiammazione ed iperalgesia, in maniera analoga a quanto precedentemente descritto.

### 3. Materiali e metodi

#### *3.1 Sintesi e caratterizzazione di PEA e dei suoi profarmaci*

##### *3.1.1 Sintesi della N-Palmitoiletanolamide (1)*

La PEA è stata sintetizzata come descritto in letteratura. [92]. IL cloruro di palmitoile e l'etanamina sono state fornite dalla Sigma-Aldrich (Milano, IT), così come il diclorometano anidro e tutti gli altri reagenti e solventi adoperati. Il prodotto finale è stato isolato all'83% di resa.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e spettro di massa erano in accordo con i dati presenti in letteratura.

##### *3.1.2 Procedura generale per la sintesi degli oligoetenesteri della PEA*

La procedura sintetica adottata è descritta in figura 14. Le anidridi succinica, ftalica e maleica, il carbonildiimidazolo (CDI), i polietilenglicoli, così come la N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC), la 4-(dimetilamino)piridina (Dmap) e lo iodometano sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. Il gel di silice, adoperato per le purificazioni (0.04-0.063 mm, 70-230 mesh) è stato ottenuto dalla Macherey-Nagel (Duren, DE). Tutti i solventi adoperati erano reagent grade e sono stati forniti dalla Fluka (Bucks, CH). Gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono stati registrati adoperando uno spettrometro Mercury plus 400 MHz (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), adoperando il trimetilsilano (TMS) come standard interno. I valori di chemical shift sono riportati in unità  $\delta$ , relative al TMS (1%). Gli spettri di massa sono stati effettuati adoperando uno spettrometro API 2000 (Applied

Biosystem, Foster City, USA). I valori di chemical shift e di m/z sono riportati in Tabella I.

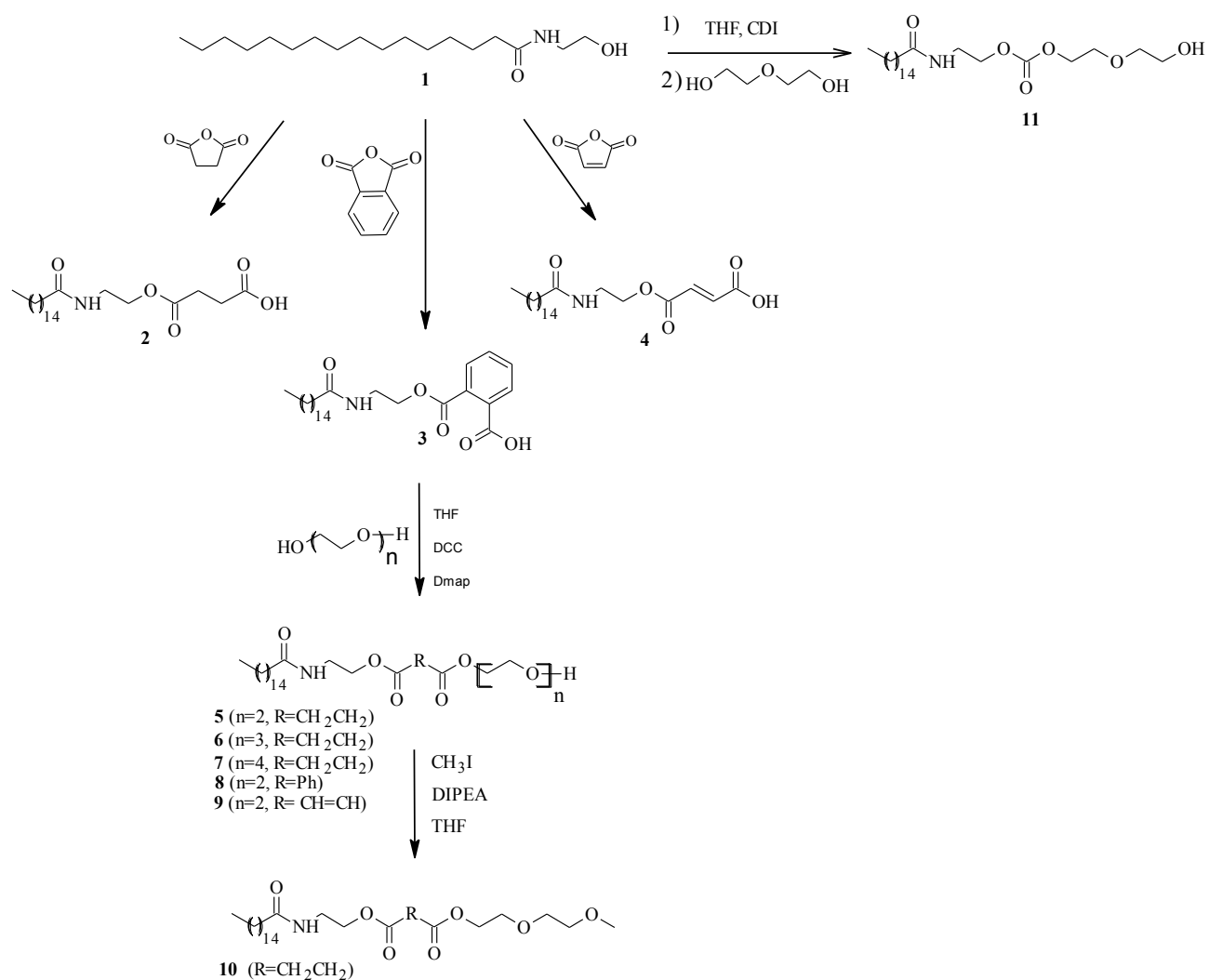


Fig. 14: Schema sintetico adoperato per la preparazione dei profarmaci della PEA

***3.1.3 Sintesi di acido 4-oxo-4-(2-palmitamidoetossi) butanoico (2) – acido (E)-4-oxo-4-(2-palmitamidoetossi)but-2-enoico (3) – acido 2-[(2-palmitamidoetossi)carbonil] benzoico (4)***

Gli intermedi **2**, **3**, and **4** sono stati sintetizzati a partire 1.00 g di PEA (3.36 mmol), che è stata fatta reagire con l'anidride corrispondente (4.36 mmol), in 25 ml di tetraidrofurano. La miscela è stata mantenuta sotto agitazione elettromagnetica, a 50°C, for 3-5h. A quel punto, 10 ml di una soluzione acquosa di HCl (2N) sono stati aggiunti e la fase organica separata dalla fase acquosa. Quest'ultima ha subito due ulteriori estrazioni in cloroformio. Le fasi organiche sono state unite, anidrificate su MgSO<sub>4</sub> anidro ed evaporate sotto vuoto. Il grezzo è stato purificato in colonna cromatografica, adoperando 9.5/0.5 cloroformio/metanolo come eluente. L'andamento della reazione, così come la purificazione, sono stati monitorati su lastra TLC in vetro (0.25 mm., 5 x 10 cm, Macherey-Nagel). Gli spot sono stati evidenziati mediante trattamento con soluzione di acido fosfomolibdico in etanolo. L'isomeria geometrica del derivato **3** è stata verificata mediante spettroscopia COSY NMR. Le rese sono state, rispettivamente del 75%, 80% e 73%

***3.1.4 Sintesi di dietilenglicol-2-palmitamidoetil succinato (5) – trietilenglicol-2-palmitamidoetil succinato (6) – tetraetilenglicol-2-palmitamidoetil succinato (7) – dietilenglicol-2-palmitamidoetil ftalato (8) – dietilenglicol-2-palmitamidoetil (E)-fumarato (9)***

Gli intermedi **2-4** (2.63 mmol) sono fatti reagire con l'opportuno polietilenglicole (3.95 mmol) in presenza di Dmap (0.03 g, 0.26 mmol) e DCC (0.54 g, 2.63 mmol) in 30 ml di THF anidro. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione elettromagnetica a Tamb per 4h. Il precipitato formatosi è stato allontanato per filtrazione, mentre il filtrato è stato evaporato sotto vuoto e ridisciolto in 15 ml di cloroformio. A questa fase organica è stata aggiunta una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub>. La fase acquosa è stata lavata 2 volte con cloroformio, quindi, le fasi organiche sono state unite, anidificate su MgSO<sub>4</sub> ed essiccate *in vacuo*. I grezzi sono stati purificati tramite cromatografia su colonna adoperando le stesse condizioni descritte per gli intermedi. Le rese sono state, rispettivamente, del 75%, 70%, 65%, 67% e 62%

***3.1.5 Sintesi del 2-(2-metossietossi)etil-2-palmitamidoetil succinato (10)***

A 0.260 g (0.547 mmol) dell'intermedio **5**, in 15 ml di acetone anidro, sono stati aggiunti, sotto agitazione elettromagnetica, Dmap (0.100 g, 0.820 mmol, 1.5 eq) e Iodometano (0.05 ml, 0.820 mmol, 1.5 eq). La soluzione è stata, quindi, riscaldata a 50°C per 2h. Dopo raffreddamento a Tamb, il solvente è stato evaporato sotto vuoto. Il solido così ottenuto è



stato solubilizzato in cloroformio ed estratto con una soluzione satura di  $\text{NaHCO}_3$  e con una soluzione di  $\text{HCl}$  (2N). La fase organica è stata anidrificata su  $\text{MgSO}_4$  e concentrata *in vacuo*. Il grezzo è stato purificato in colonna cromatografica adoperando acetato d'etile come fase mobile. La resa è stata del 71%.

### ***3.1.6 Sintesi del dietilenglicol-2-palmitamidoetil carbonato (11)***

Ad una soluzione di PEA (0.5 g, 1.167 mmol) in 17 ml diclorometano anidro, è stato aggiunto, in piccole porzioni successive, CDI (0.3 g, 1.84 mmol, 1.1 eq). La reazione è stata mantenuta sotto agitazione elettromagnetica a  $T_{amb}$  per 2h. A questo punto, il dietilenglicole (0.35 ml, 2.5 mmol, 1.5 eq) è stato aggiunto e la reazione riscaldata a  $60^\circ\text{C}$  per altre 3h. Dopo raffreddamento, si è proceduto ad un'estrazione con una soluzione satura di  $\text{NaHCO}_3$  e con una soluzione di  $\text{HCl}$  (2N). La fase organica è stata anidrificata su  $\text{MgSO}_4$ , filtrata e concentrata *in vacuo*. Il grezzo è stato purificato in colonna cromatografica adoperando acetato d'etile come fase mobile. La resa è stata del 58%

<i>Derivato</i>	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR	( <i>m/z</i> )
2	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.88 (t, 3H, J =13.5Hz), 1.22-1.40 (m, 26H), 1.60-1.65 (m, 2H), 2.20 (t, 2H, J= 15.1Hz), 2.65 (t, 2H, J= 12.2Hz), 2.71 (t, 2H, J= 12.2Hz), 3.52-3.55 (m, 2H), 4.22 (t, 2H, J = 9.8Hz), 6.00 (bs, 1H)	CD <sub>3</sub> OD: δ 14.68, 22.81, 25.83, 29.31, 29.36, 29.42, 29.50, 29.65, 29.72, 29.75, 29.76, 32.10, 36.01, 38.15, 63.50, 172.78, 173.18, 174.12	M+H <sup>+</sup> = 399,56
3	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.81 (t, 3H, J = 12.8Hz), 1.15-1.24 (m, 26H), 1.42-1.49 (m, 2H), 2.10 (t, 2H, J= 14.9Hz), 3.45 (t, 2H, J= 9.6Hz), 4.26 (t, 2H, J= 9.8Hz), 7.51 (pt, 2H, J= 6.8Hz), 7.58 (pd, 1H, J=4.7Hz), 7.7 (pd, 1H, J=4.1Hz)	CD <sub>3</sub> OD: δ 23.76, 26.95, 30.20, 30.45, 30.49, 30.60, 30.72, 30.78, 30.80, 33.09, 37.09, 39.30, 65.20, 129.67, 130.25, 132.06, 132.44, 133.30, 134.11, 169.80, 170.61, 176.66	M+H <sup>+</sup> = 448,30 M+Na <sup>+</sup> =470,30
4	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.90 (t, 3H, J =13.2Hz), 1.10-1.22 (m, 26H), 1.58-1.63 (m, 2H), 2.30 (t, 2H, J= 14.9Hz), 3.60-3.65 (m, 2H), 4.35 (t, 2H, J= 10.0Hz), 5.83 (bs, 1H), 6.30 (d, 1H, J=11.7Hz), 6.40 (d, 1H, J=10.6Hz)	CD <sub>3</sub> OD: δ 14.35, 22.91, 26.04, 29.45, 29.59, 29.74, 29.88, 29.93, 32.14, 32.62, 38.94, 64.47, 129.89, 131.87, 166.19, 166.81, 175.73	M+H <sup>+</sup> = 398,86
5	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.87 (t, 3H, J = 13.3Hz), 1.19-1.35 (m, 26H), 1.57-1.65 (m, 2H), 2.17 (t, 2H, J= 15.7Hz), 2.62-2.70 (m, 4H), 3.50-3.54 (m, 2H), 3.61 (t, 2H, J=4.4Hz), 3.69-3.74 (m, 4H), 4.20 (t, 2H, J = 9.5Hz), 4.27 (t, 2H, J= 8.4Hz), 5.97 (bs, 1H)	CD <sub>3</sub> OD: δ 14.60, 23.90, 27.21, 29.97, 30.42, 30.61, 30.63, 30.80, 30.89, 30.92, 30.94, 33.23, 37.18, 39.51, 62.30, 64.35, 65.11, 70.86, 73.77, 174.08, 175.08, 176.76	M+H <sup>+</sup> = 487,67
6	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.88 (t, 3H, J = 13.4Hz), 1.24-1.38 (m, 26H), 1.58-1.64 (m, 2H), 2.18 (t, 2H, J= 15.0Hz), 2.63-2.71 (m, 4H), 3.53-3.57 (m, 2H), 3.61 (t, 2H, J= 5.0Hz), 3.66-3.74 (m, 8H), 4.21 (t, 2H, J = 9.8Hz), 4.28 (t, 2H, J = 8.7Hz), 6.00 (bs, 1H)	CD <sub>3</sub> OD: δ 15.95, 24.10, 26.13, 30.65, 30.71, 30.76, 30.84, 30.95, 31.03, 31.06, 31.08, 33.43, 37.40, 39.44, 62.35, 64.35, 64.84, 70.15, 71.54, 73.77, 174.08, 174.55, 176.76	M+H <sup>+</sup> = 531,72
7	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.88 (t, 3H, J = 7.0), 1.26-1.31 (m, 26H), 1.58-1.64 (m, 2H), 2.18 (t, 2H, J= 15.4Hz), 2.62-2.70 (m, 4H), 3.53-3.57 (m, 2H), 3.63 (t, 2H, J= 4.7) 3.65-3.75 (m, 12H), 4.22 (t, 2H, J = 9.7Hz), 4.25 (t, 2H, J = 9.0Hz), 6.0 (bs, 1H)	CD <sub>3</sub> OD: δ 15.97, 24.10, 26.15, 30.64, 30.71, 30.77, 30.85, 30.97, 31.02, 31.05, 31.09, 33.45, 37.41, 39.45, 62.40, 64.37, 64.84, 70.15, 71.54, 71.76, 73.77, 174.09, 174.57, 176.73	M+H <sup>+</sup> =576,43
8	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.91 (t, 3H, J = 13,5Hz), 1.22-1.36 (m, 26H), 1.60-1.65 (m, 2H), 2.22 (t, 2H, J= 15.4Hz), 3.62-3.69 (m, 4H), 3.75-3.78 (m, 2H), 3.85 (t, 2H, J=9.0Hz), 4.47 (t, 2H, J= 10.2Hz), 4.51 (t, 2H, J = 9.1Hz), 6.3 (bs, 1H), 7.61 (pt, 2H, J=7.2Hz), 7.74 (pd, 1H, J=5.0Hz), 7.82 (pd, 1H, J=4,4Hz)	CD <sub>3</sub> OD: δ 14.46, 23.75, 26.98, 30.24, 30.46, 30.49, 30.61, 30.73, 30.79, 30.80, 33.09, 37.09, 39.33, 62.20, 65.29, 66.10, 69.91, 73.70, 130.10, 132.47, 132.51, 133.19, 133.31, 168.97, 169.08, 176.64	M+H <sup>+</sup> =536,73
9	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.91 (t, 3H, J =13.5Hz), 1.11-1.24 (m, 26H), 1.60-1.65 (m, 2H), 2.22 (t, 2H, J= 15.1Hz), 3.49-3.53 (m, 2H), 3.61-3.66 (m, 4H), 3.8 (t, 2H, J= 5.2Hz), 4.32 (t, 2H, J= 9.9Hz), 4.41 (t, 2H, J=8.5Hz), 5.80 (bs, 1H), 6.31 (pd, 1H, J=11,7Hz), 6.37 (pd, 1H, J=11.9Hz)	CD <sub>3</sub> OD: δ 13.92, 22.08, 25.15, 28.60, 28.68, 28.76, 28.81, 28.87, 28.92, 29.03, 35.28, 37.26 63.06, 64.55, 65.26, 70.98, 73.67, 128.55, 131.57, 165.10, 166.45, 172.42	M+H <sup>+</sup> =486,13
10	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.88 (t, 3H, J = 13.5Hz), 1.18-1.35 (m, 26H), 1.55-1.64 (m, 2H), 2.18 (t, 2H, J= 15.5Hz), 2.62-2.70 (m, 4H), 3.50 (s, 3H), 3.51-3.54 (m, 2H), 3.62 (t, 2H, J=4.2Hz), 3.71-3.75 (m, 4H), 4.22 (t, 2H, J = 9.6Hz), 4.30 (t, 2H, J= 8.5Hz), 6,00 (bs, 1H)	CD <sub>3</sub> OD: δ 14.62, 23.88, 27.24, 29.95, 30.50, 30.66, 30.68, 30.78, 30.91, 30.94, 30.98, 33.24, 37.19, 39.54, 58.91, 62.28, 64.32, 65.12, 70.84, 73.79, 174.01, 175.11, 176.79	M+H <sup>+</sup> = 502,82
11	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.88 (t, 3H, J = 13.4Hz), 1.10-1.25 (m, 26H), 1.54-1.62 (m, 2H), 2.17 (t, 2H, J= 15.4Hz), 3.55-3.58 (m, 2H), 3.62 (t, 2H, J=8.4Hz), 3.67-3.76 (m, 4H), 4.23 (t, 2H, J = 10.4Hz), 4.33 (t, 2H, J= 9,1Hz), 5,85 (bs, 1H)	CD <sub>3</sub> OD: δ 14.43, 23.74, 26.01, 26.99, 30.18, 30.32, 30.39, 30.47, 30.62, 30.73, 33.76, 30.78, 33.07, 34.97, 37.12, 42.91, 61.64, 62.19, 64.58, 70.13, 73.63, 163.36, 176.65	M+H <sup>+</sup> = 431,97 M+Na <sup>+</sup> = 454,30

Tab. I: Dati spettroscopici per i profarmaci sintetizzati e loro intermedi

### 3.2 Sintesi e caratterizzazione dei co-drug di PEA

La procedura sintetica adottata è descritta in figura 15. Cloruro di butirrile ed l-mentolo sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. L'acido trans-traumatico è stato un gentile omaggio della Epitech group srl (Saccolongo, IT). I dati spettroscopici sono indicati in tabella II. Le isomerie ottiche, geometriche e conformazionali sono state verificate mediante l'ausilio di spettri COSY.

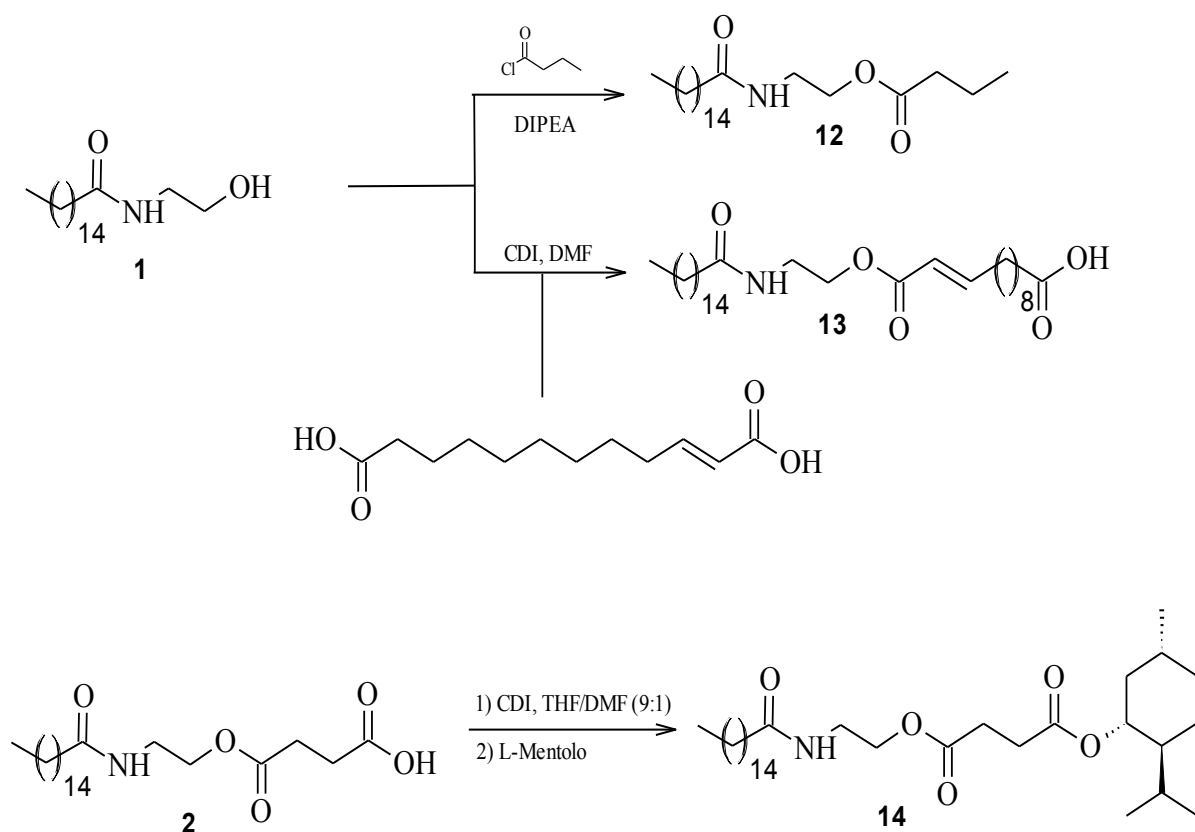


Fig. 15: Schema sintetico adoperato per la preparazione dei co-drug della PEA

### 3.2.1 Sintesi del 2-pamitamidoetil butirrato (12)

Ad una soluzione di 100 mg di PEA (0.34 mmol) e 58.5  $\mu\text{L}$  di N,N'-diisopropiletilamina (0.34 mmol) in 10 ml di DMF sono aggiunti, goccia a goccia, 52.3  $\mu\text{L}$  di butirril cloruro (0.500 mmol) diluiti in 2.5 ml di THF. La reazione è stata mantenuta a  $T_{\text{amb}}$  per 5h, sotto agitazione elettromagnetica. A quel punto, il solvente è stato evaporato sotto vuoto. Il residuo è stato ridisciolti in cloroformio ed estratto, successivamente, con una soluzione satura di  $\text{NaHCO}_3$  e con una soluzione di  $\text{HCl}$  (2N). La fase organica è stata anidrificata su  $\text{MgSO}_4$ , filtrata e concentrata *in vacuo*. Il grezzo è stato purificato in colonna cromatografica adoperando 98/2 cloroformio/metanolo come fase eluente. La resa è stata del 77%.

### 3.2.2 Sintesi dell'acido (E)-12-oxo-12-(2-palmitamidoetossi)dodec-10-enoico (13)

Ad una sospensione di acido traumatico (0.5 g, 2.19 mmol) in 20 ml DMF sono stati aggiunti, a porzioni successive, 0.43 g di CDI (2.63 mmol). La reazione è stata mantenuta sotto agitazione, a  $T_{\text{amb}}$ , fino alla scomparsa dell'effervescenza, tipica del CDI, ed alla completa solubilizzazione del solido sospeso. Quindi, sono stati aggiunti 10 ml di DMF contenenti 0.66 g di PEA (2.19 mmol). La reazione è stata mantenuta a 50°C per le successive 12h. Successivamente, il solvente è stato evaporato, il solido ridisciolti in cloroformio ed estratto con una soluzione di  $\text{HCl}$  (2N). LA fase organica è stata anidrificata su  $\text{MgSO}_4$ , filtrata e concentrata *in vacuo*. Il grezzo è stato purificato in colonna impiegando 96/4 cloroformio

metanolo come miscela eluente. La resa isolata della reazione è stata del 32%.

### ***3.2.3 Sintesi del (1S, 3S, 4R)-4-isopropil-3-metilcicloesil-2-palmitamidoetil succinato (14)***

Ad una soluzione di 200 mg di intermedio **2** (0.5 mmol) in 10 ml di THF/DMF (9/1) sono stati aggiunti 89.2 mg di CDI (0.55 mmol). La reazione è stata mantenuta a  $T_{amb}$  per circa 2h. A quel punto, sono stati aggiunti 117 mg di l-mentolo (0.75 mmol) disciolti in 2.5 ml di THF e la reazione è stata mantenuta a  $T_{amb}$  per 4h. Il solvente è stato, quindi, evaporato sotto vuoto. Il residuo è stato ridisciolti in cloroformio ed estratto, successivamente, con una soluzione satura di  $\text{NaHCO}_3$ . La fase organica è stata anidrificata su  $\text{MgSO}_4$ , filtrata e concentrata *in vacuo*. Il grezzo è stato purificato in colonna cromatografica adoperando 7/3 esano/acetato d'etile come fase eluente. La resa è stata del 61%.

<i>Derivato</i>	<i><sup>1</sup>H NMR</i>	<i><sup>13</sup>C NMR</i>	<i>(m/z)</i>
12	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.88 (t, 3H, J =13.7Hz), 0.95 (t, 3H, J= 10.2Hz), 1.23-1.39 (m, 26H), 1.61-1.69 (m, 4H), 2.17 (t, 2H, J= 15.3Hz), 2.31 (t, 2H, J= 14.8Hz), 3.51-3.55 (m, 2H), 4.17 (t, 2H, J = 10.5Hz), 5.72 (bs, 1H)	CDCl <sub>3</sub> : δ 13.63, 14.10, 18.38, 22.67, 25.66, 29.26, 29.33, 29.47, 29.60, 29.63, 29.67, 31.09, 36.03, 36.74, 38.83, 63.08, 173.24, 173.80	M+H <sup>+</sup> = 384.01
13	DMSO-d <sub>6</sub> : δ 0.87 (t, 3H, J =13.1Hz), 1.24-1.41 (m, 34H), 1.35-1.50 (m, 2H), 1.57-1.62 (m, 2H), 2.12-2.18 (m 4H), 2.30 (t, 2H, J= 14.5Hz), 3.49-3.53 (m, 2H), 4.20 (t, 2H, J = 10.1Hz), 5.68 (bs, 1H), 5.82 (d, 1H, J=15.4), 7.04-7.12 (m, 1H), 12.02 (bs, 1H)	DMSO-d <sub>6</sub> : δ 14.06, 21.04, 24.93, 26.19, 27.91, 28.45, 28.93, 29.11, 29.40, 29.52, 29.61, 29.65, 31.28, 31.80, 33.65, 34.11, 38.42, 41.01, 63.65, 122.40, 150.51, 167.58, 172.31, 175.45	M+H <sup>+</sup> = 528.70 M+Na <sup>+</sup> =550.52
14	CDCl <sub>3</sub> : δ 0.89 (d, 3H, J =2.7Hz), 0.93-0.96 (m, 9H), 1.02,1.20 (m, 1H), 1.24-1.40 (m, 26H), 1.41-1.43 (m, 1H), 1.62-1.69 (m, 4H), 1.83 (m, 1H), 1.94 (m, 1H), 2.17 (t, 2H, J= 14.9Hz), 2.62 (t, 4H, J=12Hz), 3.50-3.53(m, 2H), 4.20 (t, 2H, J = 10.1Hz), 4.62 (m, 1H), 6.01 (bs, 1H)	CDCl <sub>3</sub> : δ 14.10, 16.29, 20.65, 21.94, 22.63, 23.41, 25.65, 26.24, 29.30, 29.35, 29.49, 29.59, 29.64, 31.38, 31.87, 34.13, 36.58, 40.81, 46.91, 63.57, 74.82, 172.18, 172.27, 173.47	M+H <sup>+</sup> = 539.20

Tab. II: Dati spettroscopici per i co-drug sintetizzati

### ***3.3 Preparazione delle NLC***

Per la preparazione delle NLC sono state effettuate, innanzitutto, delle prove di solubilità della molecola in lipidi potenzialmente adoperabili per la formulazione delle NLC. I lipidi sono stati selezionati in base all'esperienza ed in funzione dell'intervallo di fusione della PEA (95-103°C), misurato mediante apparecchiatura digitale SMP10 (WWR International PBS srl, IT). Le prove di solubilità sono state effettuate portando una quantità pesata del lipide selezionato alla temperatura di fusione e aggiungendo concentrazioni crescenti di PEA. In questo modo si è determinata anche la massima quantità di PEA adoperabile per unità di peso di lipide. I lipidi testati sono stati :

- Compritol 888 ATO (Gattefossè Italia srl, IT), una miscela composta da circa il 15% di mono-, il 50% di di- e il 35% di trigliceridi dell'acido beenico (C22), con intervallo di fusione 69-74°C
- Cetil Palmitato Pellets (ACEF, IT), estere con punto di fusione a 54°C
- Geleol mono e digliceride (Gattefossè Italia srl, IT) forma commerciale di gliceril stearato con intervallo di fusione 54-64°C
- Miglyol 812 (Eigenmann & Veronelli spa, IT), trigliceride dell'acido caprilico e caprico (C8/ C10), liquido a Tamb

Tra questi il Compritol 888 ATO ed il Miglyol sono stati i più performanti in termini di solubilità assoluta di PEA, e reciproca capacità di

miscelazione in assenza di precipitati. Anche in funzione di conoscenze pregresse, a questa miscela di lipidi, per la formulazione delle NLC è stato aggiunto, come tensioattivo, Lutrol F 68, un polossamero costituito per l'81% da unità di poliossietilene e per il 19% da unità di poliossipropilene (BASF AG, DE). I solventi e l'acqua adoperati erano di grado HPLC e sono stati forniti dalla Carlo Erba reagenti (Milano, IT). Le NLC sono state preparate con la tecnica di "*high shear homogenization*"(HSH). Tale metodo prevede l'iniziale formazione a caldo di una pre-emulsione olio/acqua, la quale viene trasformata in nano-emulsione mediante omogeneizzazione. La dispersione, così ottenuta, è convertita per successivo raffreddamento nel sistema nanoparticellare. Il Miglyol 812 (0,375 g), il Compritol 888 ATO (1,5 g) e la fase acquosa di Lutrol F 68 (0,1 g) sono stati portati, separatamente, alla temperatura di  $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  (circa  $10^{\circ}\text{C}$  superiore rispetto al punto di fusione del lipide solido), e mantenuti sotto agitazione magnetica. La palmitoiletanolamide (0,26 g, 0,5% del volume totale) è stata aggiunta al lipide liquido fino a completa dissoluzione. La miscela PEA/lipide liquido è stata, quindi, miscelata con il lipide solido fuso. Miglyol 812, Compritol 888 ATO e PEA costituivano, a questo punto, un'unica fase lipidica. Quest'ultima è stata trasferita alla fase acquosa di tensioattivo, mantenendo sotto agitazione elettromagnetica per favorire la formazione della pre-emulsione olio/acqua. La pre-emulsione è stata quindi sottoposta ad omogeneizzazione mediante l'uso dell'omogeneizzatore ad alta pressione Ultra-Turrax T25 Basic (IKA-Werke GmbH & Co., DE) ad una velocità di 13500 rpm per 10 min e a temperatura costante. L'emulsione così ottenuta è stata trasferita in 25 ml di acqua alla temperatura di  $4^{\circ}\text{C}$ , all'interno di un bagno di ghiaccio, agitando costantemente la preparazione. Il raffreddamento ha consentito la solidificazione del Compritol 888 ATO e la conseguente formazione del sistema nanoparticellare.



### ***3.4 Caratterizzazione delle NLC***

#### ***3.4.1 Analisi dimensionale: Spettroscopia di fotocorrelazione***

La dimensione media delle nanoparticelle è stata misurata mediante spettroscopia di fotocorrelazione (PCS) mediante l'uso di uno Zeta Sizer Nano-ZS90 (Malvern Instrument Ltd., UK).

Il metodo di misurazione si basa sulla spettroscopia di correlazione fotonica (Laser Light Scattering), fondata sul principio della diffusione dinamica della luce. Il sistema di analisi prevede sei angoli di diffrazione della luce compresi fra 11 e 90° che permettono di caratterizzare campioni contenenti particelle di diverse dimensioni.

La spettroscopia di correlazione fotonica, definita anche Dynamic Light Scattering (DLS), è una tecnica usata per determinare il coefficiente di diffusione traslazionale di piccole particelle contenute in un liquido, misurando le fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa dovute ai moti browniani delle particelle. Le fluttuazioni nel tempo dell'intensità diffusa vengono analizzate da un correlatore e dalla Funzione di correlazione si ricava il coefficiente di diffusione traslazionale (DT); dal coefficiente di diffusione traslazionale è possibile ricavare il raggio idrodinamico delle particelle (RH), mediante l'equazione di Stokes-Einstein [93]. Le analisi sono state condotte con un angolo di diffusione di 90° ad una temperatura di  $20 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ .

La preparazione è stata trasferita nell'apposita cuvetta e quindi sottoposta all'analisi. Ogni misurazione è stata effettuata in triplicato, per cui i valori di diametro idrodinamico sono indicati come valore medio delle tre misurazioni, cui è stato associato l'indice di polidispersione (PDI), che

rappresenta una misura dell'omogeneità della popolazione particellare, il cui valore va da 0 a 1. Valori ottimali di PDI sono dell'ordine di 0.2- 0.3 unità.

#### ***3.4.2 Potenziale Zeta: Electrophoretic Light Scattering***

Per la misurazione del potenziale zeta delle NLC è stato adoperato il medesimo strumento impiegato per la PCS. In questo caso, la tecnica utilizzata tecnica è stata l'Electrophoretic Light Scattering [94], che misura la mobilità elettroforetica di particelle in dispersione o molecole in soluzione. La mobilità è convertita in potenziale zeta per consentire un confronto di materiali in diverse condizioni sperimentali. Risultati ottimali si ottengono per valori di potenziale zeta di  $\pm 25$  mV.

Nello studio effettuato sono state usate cuvette riempite della preparazione di NLC diluita con acqua. Il rapporto di diluizione scelto è 1: 20. Le misure sono state effettuate in triplicato.

#### ***3.4.3 Analisi termocalorimetrica: Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)***

La calorimetria a scansione differenziale è stata utilizzata per caratterizzare il comportamento termico delle nanoparticelle.

Gli studi di calorimetria differenziale a scansione sono stati eseguiti mediante lo strumento METTLER TA89E (Mettler-Toledo spa, IT), un

calorimetro equipaggiato con un sistema di raffreddamento ad azoto liquido. Un purge di azoto con una velocità di flusso di 50 cm<sup>3</sup>/min è stato utilizzato per fornire un ambiente di gas inerte nella cella di misura. Lo strumento è stato, dapprima, calibrato utilizzando un pan contenente Indio e uno vuoto ermeticamente sigillato. Una certa quantità di campione liofilizzato (10 mg) è stata inserita in un pan di capienza pari a 150 µl.

Nella fase di riscaldamento, la rampa di temperatura selezionata è stata da 20°C a 150°C alla velocità di 5°C/ min. Nella successiva fase di raffreddamento velocità di raffreddamento utilizzata è stata di 10°C/ min.

Sono state eseguite misure calorimetriche in triplicato per i seguenti campioni:

- NLC formulate in assenza di PEA (NLC vuote)
- NLC contenenti PEA
- NLC in presenza di PEA adsorbita sulla superficie esterna (NLC PEA out)
  - Lutrol F68
  - Compritol 888 ATO
  - PEA

#### ***3.4.4 Analisi di microscopia elettronica di trasmissione (TEM)***

Le analisi sono state effettuate con un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) 120kV Philips EM 400T (Philips, DE). Il campione, adeguatamente diluito (1000 x) con tampone fosfato 0.1M è stato depositato su un retino di rame coperto da una pellicola di formvar<sup>®</sup>

(TAAB Laboratories Equipment Ltd, UK). Dopo fissazione con una soluzione di uranil acetato (2% p/v), il solvente è stato fatto evaporare a temperatura ambiente per tutta la notte, prima di procedere all'osservazione a differenti ingrandimenti [95].

### ***3.4 Studi di permeazione cutanea***

#### ***3.5.1 Permeazione cutanea in vitro***

Gli studi di permeazione cutanea *in vitro* sono stati effettuati sulle NLC, formulate come precedentemente descritto, adoperando le membrane SCE (Strato Corneo Epidermide) come modello di barriera cutanea [85]. Le SCE sono state ottenute da campioni di pelle umana essiccata, provenienti da soggetti di età compresa tra 32 e 45 anni, sottoposti ad interventi riduttivi di chirurgia estetica. Le membrane sono state reidratate al momento dell'uso, mediante immersione in acqua distillata, un'ora prima dell'inizio degli esperimenti di permeazione. Per la valutazione del grado di assorbimento percutaneo in vitro della PEA da NLC sono state utilizzate le celle di diffusione verticale tipo Franz (SES GmbH, DE). Per assicurare le cosiddette "sink conditions", il compartimento ricevente (con un volume di 4,5 ml) è stato alimentato con una soluzione idroalcolica (50% acqua: 50% etanolo). Il ricevente è stato agitato a 500 rpm e termostato alla temperatura di  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  per tutta la durata degli esperimenti di permeazione. Circa 300 mg di ciascun campione sono stati adoperati come compartimento donatore.

Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato per 24 h. Ad intervalli predeterminati, dal ricevente sono stati prelevati 200 µl di campione,

rimpiazzati con un egual volume di soluzione ricevente. I campioni sono stati, quindi, ridisciolti in 100 µl di cloroformio, filtrati attraverso microfiltri in nylon (0.45 µm, Leida, USA) ed analizzati per determinare il contenuto di PEA mediante la metodica HPLC riportata in seguito.

### ***3.5.2 Permeazione cutanea ex vivo***

Topo maschi tipo Swiss, dal peso di 25-30g (Harlan laboratories, IT) sono stati adoperati per gli esperimenti di permeazione cutanea *ex vivo* dei profarmaci della PEA. Gli animali sono stati stabulati in gabbie di acciaio inox, in ambiente a temperatura controllata ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), con un ciclo buio/luce di 12h. Gli animali sono stati acclimatati in questo ambiente per 1 settimana precedente agli esperimenti, mantenendo accesso a piacere ad acqua potabile e cibo. Soluzioni di PEA e dei suoi profarmaci sono state preparate in etanolo (2 mg/ml per PEA, concentrazioni equimolari per i profarmaci). Una quota di queste soluzioni (0.5 ml) è stata somministrata su 4 differenti siti, localizzati sul dorso degli animali, dopo epilazione. Ad intervalli predeterminati (2, 4, 6, 24, 48, 72 and 96h), gli animali sono stati sacrificati, gli strati superficiali di cute sono stati rimossi mediante tape-stripping (2 strip successive per ogni area di applicazione), in modo da rimuovere l'eccesso di sostanza presente negli strati cutanei più superficiali. La cute sottostante è stata, quindi, prelevata, pesata e omogeneizzata in una soluzione di metanolo e fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF, 1mM), che è un inibitore delle serina proteasi, in modo da evitare artefatti. Le molecole di interesse sono state isolate per estrazione e frazionamento mediante cromatografia su gel di silice, come precedentemente descritto [96]. L'efficienza del metodo estrattivo è stata

verificata in un set separato di esperimenti in cui, la cute escissa delle cavie (entro 1h dall'escissione) è stata imbibita di quantità note di PEA e profarmaci e, successivamente, estratta nelle condizioni sperimentali descritte. Le percentuali di recupero sono riportate in Tabella III.

### ***3.6 Studi di stabilità dei profarmaci***

#### ***3.6.1 Studi di idrolisi chimica***

Data la scarsa solubilità in acqua dei profarmaci sintetizzati, per gli studi di idrolisi chimica, essi sono stati disciolti in una soluzione di Tween 80 (5 mM) / methanol 10:1 (v:v), ad una concentrazione finale di 0.5 mg/ml. La fase acquosa è stata tamponata a pH 5.5 adoperando tampone acetato. Le soluzioni così ottenute sono state incubate a 37°C sotto agitazione elettromagnetica. Ad intervalli predefiniti, 200 µl di soluzione sono stati prelevati e rimpiazzati con un egual volume di soluzione fresca. I volumi prelevati sono stati diluiti 1:10 con etanolo, evaporati sotto vuoto ed essiccati per tutta la notte su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Il grezzo ottenuto è stato solubilizzato in 100 µl di cloroformio, filtrato su microfiltri di Nylon e analizzato all'HPLC.

#### ***3.6.2 Studi computazionali di idrolisi enzimatica***

Gli studi di idrolisi enzimatica sui profarmaci sono, solitamente, effettuati mediante modelli *in vitro*, che prevedono l'impiego di esterasi di origine animale. La mancata solubilità in ambiente acquoso, l'unico nel

quale gli enzimi dimostrano funzionalità, può essere ovviata mediante l'impiego di sistemi cosolventi. [97]. Nel caso specifico, i profarmaci della PEA non solo risultano poco solubili in acqua, ma poco solubili anche nei cosolventi proposti in letteratura, ad eccezione delle soluzioni, contenenti Tween 80, adoperate per i saggi di idrolisi chimica (vedi paragrafo 3.7.1). Il problema è che il Tween 80 è, anch'esso un estere ed, in quanto tale, interferisce sulla attività delle esterasi porcine, come dimostrato dal rallentamento dell'idrolisi dell'acido acetilsalicilico, effettuata, nello stesso sistema solvente descritto per i saggi di idrolisi chimica (dati non mostrati). Di conseguenza, considerando le carbossiesterasi II (CES II) come le esterasi maggiormente presenti al livello cutaneo [98], l'idrolisi enzimatica è stata valutata mediante metodi computazionali adoperando la CES II come modello di enzima. Nello specifico, il comportamento conformazionale dei sei derivati è stato investigato mediante procedura MonteCarlo (nel miglioramento effettuato in VEGA), la quale ha generato 1000 conformomeri mediante rotazione casuale. Per ognuno dei ligandi la conformazione a minore energia è stata adoperata per gli esperimenti di docking. Tali esperimenti sono stati effettuati adoperando la metodica PLANTS, che ricerca le plausibili pose del ligando, attraverso l'ant colony algorithms (ACO). Per tutte le simulazioni di docking, il PLANTS è stato impostato con i parametri di default, senza imporre costrizioni geometriche. La ricerca è stata focalizzata intorno ad una sfera con raggio di 10.0 Å, nei pressi del residuo catalitico di Ser288, includendo, in questo modo, l'intera cavità catalitica dell'enzima. Le pose registrate sono state classificate mediante la funzione ChemPLP, usando velocità 1. Dieci differenti pose sono state generate da ogni ligando studiato. Le migliori sono state selezionate considerando, sia il punteggio ChemPLP che la vicinanza spaziale tra la funzione labile del substrato ed il residuo Ser288. I complessi selezionati in questo modo, sono stati minimizzati, mantenendo

fisse le posizioni degli atomi al di fuori del raggio di 10.0 Å e le strutture minimizzate sono state, alla fine, adoperate per calcolare:

- 1) Il punteggio della funzione PLATS (ChemPLP, PLP e PLP95)
- 2) Il punteggio della funzione Autodock
- 3) Il punteggio della funzione CHARMM-based, come da programma VEGA
- 4) Il punteggio idrofobico, come MLPInS, così come recentemente proposto

I ligandi estratti dalle migliori pose sono stati utilizzati per generare un set di proprietà conformomero-dipendenti che, aggiunte alle proprietà conformomero-indipendenti, costituiscono il pool di descrittori dei ligandi. Questi descrittori, in aggiunta ai punteggi di docking, sono stati adoperati per gli studi di correlazione.

### ***3.7 Analisi HPLC***

L'analisi HPLC è stata condotta su un apparecchiatura della Jasco (USA) composta da una pompa a gradiente quaternario (PU 2089 Plus), una valvola di iniezione rheodyne da 25 µl ed un detector UV diode array (MD 2010 Plus). Il metodo analitico adoperato è stato già descritto in letteratura [99]. In breve, data l'incapacità dei derivati sintetizzati di assorbire la radiazione UV, si è adoperata una metodica di derivatizzazione pre-colonna mediante l'impiego di una sonda fluorescente rappresentata dal Cloruro di Dansile. La metodica adoperata è conforme a quanto descritto nella letteratura citata, ed è stata standardizzata seguendo le indicazioni



della Farmacopea Statunitense (USP 37). Anche l'assenza di picchi interferenti provenienti dai campioni di cute è stata verificata in esperimenti in bianco. I parametri analitici del metodo sono descritti in tabella III

<b>Derivato</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>Intervallo di linearità (µg/ml)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Fattore di risoluzione</b>	<b>% di recupero dal tessuto</b>
<b>1</b>	28,5	0,32-10,00	0,988	-----	95-115
<b>5</b>	25,4	0,45-10,00	0,981	2,06	88-99
<b>6</b>	23,2	0,50- 8,00	0,981	3,25	85-98
<b>7</b>	22,6	0,50- 8,00	0,976	3,60	85-94
<b>8</b>	27,4	0,47-9,30	0,984	1,05	89-99
<b>9</b>	24,9	0,51-8,70	0,987	2,16	90-97
<b>10</b>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<b>11</b>	24,6	0,49-9,10	0,972	2,30	84-94

*Tab. III: Dati analitici e percentuali di recupero dal tessuto per PEA ed i suoi profarmaci*

### **3.8 Farmacologia**

#### **3.8.1 Esperimenti in vivo**

Gli animali adoperati per gli esperimenti *in vivo*, così come la loro provenienza e le metodiche di stabulazione sono conformi a quanto indicato nel paragrafo **3.5.2**.

Le sostanze testate sono state disciolte, così come la PEA in etanolo assoluto (2 mg/ml per PEA, concentrazioni equimolari per i profarmaci). 0.5 ml di queste soluzioni sono state applicate, topicamente, ad ogni topo, sulla zampa sinistra. 5 minuti dopo l'applicazione, agli animali sono stati iniettati 0.5 µl di soluzione sterile salina contenente l'1% di  $\lambda$ -carragenina nella medesima zampa. Agli animali del gruppo di controllo è stato applicato, topicamente, esclusivamente il veicolo (etanolo). Ad intervalli predeterminati successivi all'iniezione il volume della zampa (edema, n=6) e l'iperalgia meccanica (n=6) sono stati misurati.

Il volume della zampa è stato misurato mediante pletismometro (Ugo Basile, IT), a differenti intervalli di tempo. L'incremento del volume è stato valutato come differenza tra il volume misurato ad ogni intervallo temporale ed il volume basale, misurato al tempo 0, prima dell'applicazione topica delle molecole e dell'iniezione di carragenina.

L'iperalgia meccanica è stata, invece, stabilita attraverso la misurazione del tempo di latenza tra l'applicazione di una pressione meccanica costante e la ritrazione della zampa da parte della cavia. Un cilindro di vetro dal diametro di 10 mm, con un'estremità conica del diametro di 3 mm, e dal peso calibrato di 15 g è stato adoperato per esercitare la pressione meccanica. Il peso è stato sospeso verticalmente tra due anelli, a loro volta fissati ad un'asta, ed era libero di muoversi verticalmente. Un tempo di cut-off di 90s è stato adoperato nelle misurazioni. I profarmaci della PEA ed il co-drug **14** sono stati valutati, farmacologicamente, mediante l'uso di questo metodo, così come le NLC, con un'unica differenza. Le NLC non si presentavano adatte all'applicazione topica, dal momento che, a differenza delle soluzioni etanoliche, non andavano incontro ad assorbimento ed erano passibili di rimozione da parte della cavia. Di conseguenza, il protocollo adoperato per

le NLC ha previsto l'iniezione sub-plantare delle stesse. Nello specifico, 30 minuti dopo l'iniezione di 0.5  $\mu$ l di soluzione sterile salina contenente l'1% di  $\lambda$ -carragenina, sono stati iniettati, nella stessa zampa 0.5  $\mu$ l di solo veicolo (n=6), di una soluzione contenente PEA (0.5% p/v, n=6), di NLC vuote (0.5% p/v) e di NLC caricate con PEA (0.5% p/v).

### ***3.8.2 Esperimenti in vitro***

Per i saggi cellulari sono state adoperate cellule HaCaT, linea immortalizzata di cheratinociti umani,. Tali cellule sono state mantenute, in coltura, in fiasche di polistirene da 75 cm<sup>2</sup> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) al 10% di siero bovino fetale (FBS) e penicillina/streptomicina (10.000 U/ml), ad una temperatura di 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub> in atmosfera umidificata.

Raggiunta la confluenza, le cellule sono state tripsinizzate utilizzando una soluzione contenente lo 0,5% (p/v) di tripsina e lo 0,2% di EDTA. Per la determinazione dell'effetto cicatrizzante dei co-drug **12** e **13**, è stato adoperato il Wound Healing Assay (Scratch Assay). Tale saggio in vitro permette di valutare la mobilità cellulare nelle due dimensioni.

Le cellule HaCaT sono state piastrate in una multi-well da 12 (100.000 cellule/pozzetto) in mezzo al 10% di FBS. Dopo 6h di adesione, è stato praticato uno striscio con un tip sterile da 1000 $\mu$ l sullo strato di cellule. Sono stati, quindi, effettuati due lavaggi in tampone fosfato sterile (PBS) per rimuovere le cellule in sospensione. I cheratinociti sono stati stimolati in mezzo contenente l'1% di FBS con PEA (n=5), butirrato di sodio (BuNa) (n=5), Acido traumatico (n=5) ed i derivati sintetizzati (n=5),

tutti utilizzati alla concentrazione di 10  $\mu$ M. Tutte le sostanze sono state sciolte in DMSO puro. La concentrazione di DMSO era dell'1%. Sono state, quindi, effettuate foto dello striscio al tempo zero (t0h) e dopo 48h (t48h), mediante l'uso di una telecamera DFC295 (Leica, DE), montata su un microscopio Leitz (DE) invertito a contrasto di fase. La migrazione delle cellule è stata determinata misurando l'ampiezza dello striscio al tempo zero e sottraendo tale valore all'ampiezza dello striscio a 48h. La quantificazione dell'ampiezza dello striscio è stata effettuata utilizzando il software ImageJ . I valori ottenuti sono stati espressi come percentuale di migrazione, ponendo l'ampiezza dello striscio al tempo zero come uguale al 100%.

### ***3.9 Analisi statistica***

I risultati sono stati espressi come la media  $\pm$  S.E.M. di n esperimenti. Per l'analisi statistica è stato adoperato il software Graph-Pad Prism (GraphPad Software Inc., USA). La significatività delle differenze tra i gruppi è stata valutata mediante il test-t di Student (per gli esperimenti *ex-vivo* ed *in vitro*), mentre il test ANOVA è stato impiegato per i test *in vivo*, seguito dal test post-hoc di Bonferroni per le comparazioni multiple. Differenze con  $p < 0.05$  sono state considerate statisticamente significative in questi studi.

## 4. Risultati

### 4.1 Profarmaci dermici

#### 4.1.1 *Profarmaci dermici: efficacia farmacologica*

Come atteso, l'iniezione di carragenina nella zampa della cavia è in grado di determinare sia significativa iperalgesia, come osservabile dalla riduzione dei tempi di ritrazione della zampa (Figura 16B-D e 17 B-D, barre bianche), ed un evidente edema, come osservabile dall'incremento del volume della zampa (Figura 16A-C e 17A-C). La somministrazione di PEA (1mg/zampa), riduce in maniera evidente sia l'iperalgesia che l'edema in modo tempo dipendente. In particolare, gli effetti farmacologici sono riscontrabili fino a 4h successive all'applicazione, per poi scomparire nell'arco dell'intero time-course osservato (Figura 17A-D, derivato 1). Gli effetti riscontrati per applicazione topica dei profarmaci sintetizzati, invece, consentono una separazione, schematica, in tre differenti gruppi.

Al primo gruppo appartengono i derivati **7**, **8** e **11**, dimostratisi totalmente inattivi nei modelli farmacologici adoperati ed i cui dati, per semplicità di trattazione, non sono mostrati.

Al secondo gruppo appartiene, invece, il derivato **9**, il quale mostra un effetto moderato e di breve durata. La molecola è attiva, farmacologicamente, tra la quarta e la sesta ora successive all'applicazione topica, perdendo totalmente attività nell'arco delle prime 24h (Figura 16A-B).

I derivati **5**, **6**, e **10**, dall'altro lato, rappresentano il gruppo di molecole con la più interessante attività antiiperalgesica ed

antiinfiammatoria, rispetto ai presupposti della loro progettazione. Essi, infatti, presentano insorgenza d'azione ritardata (6h per **5** e **10**, 48h per **6**) associata ad una durata d'azione, decisamente, prolungata (3 giorni per **5** e **10**, 4 giorni per **6**). Un ulteriore aspetto da valutare è rappresentato dalla completa sovrapponibilità degli effetti farmacologici tra i derivati **5** e **10**, che, indubbiamente, risultano molto simili da un punto di vista chimico (Figure 16A-B e 17C-D).

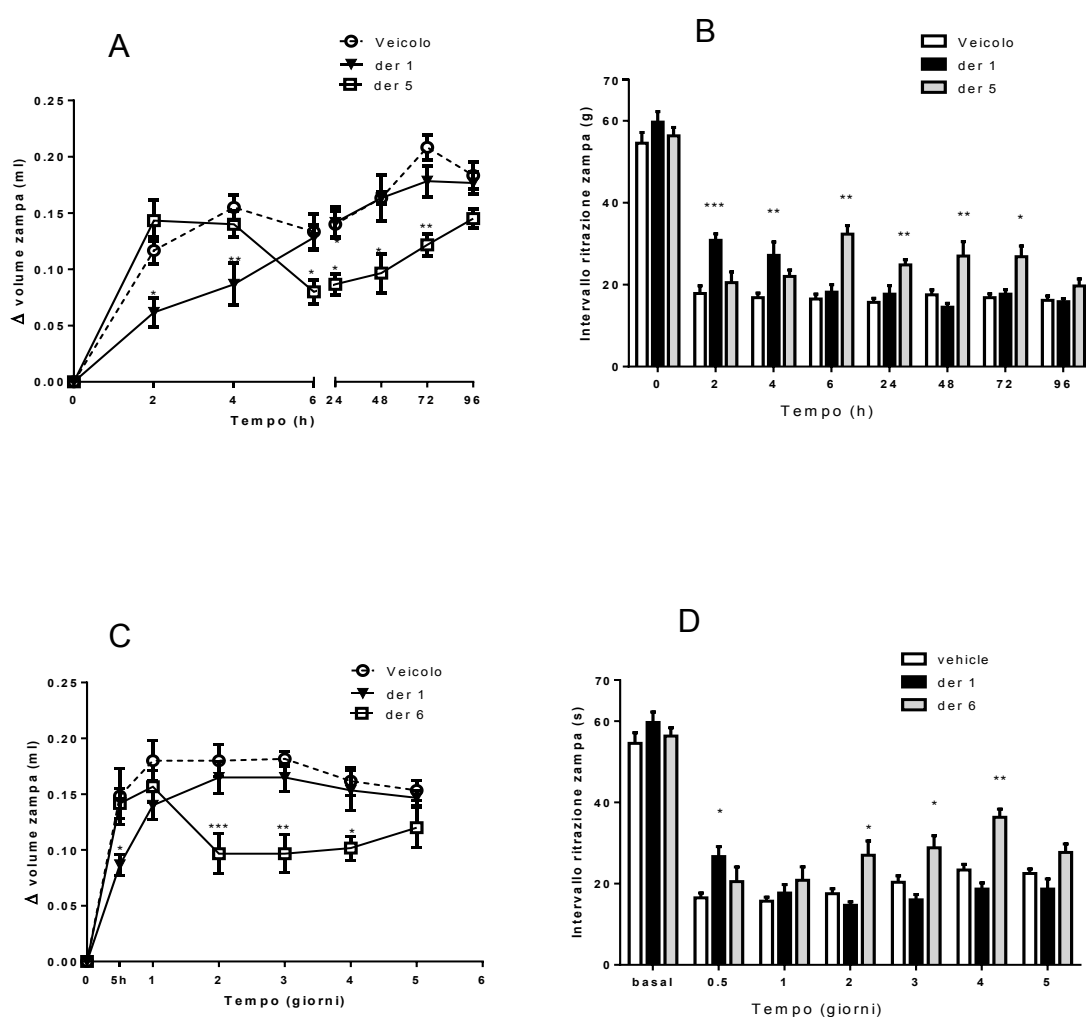


Figura 16: Effetti dell'applicazione topica del veicolo (CTR), della PEA (der 1) e dei profarmaci 5 e 6 sull'edema (A, C) e sull'iperalgia meccanica (B, D). I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  e \*\*\* $p<0.001$  vs CTR

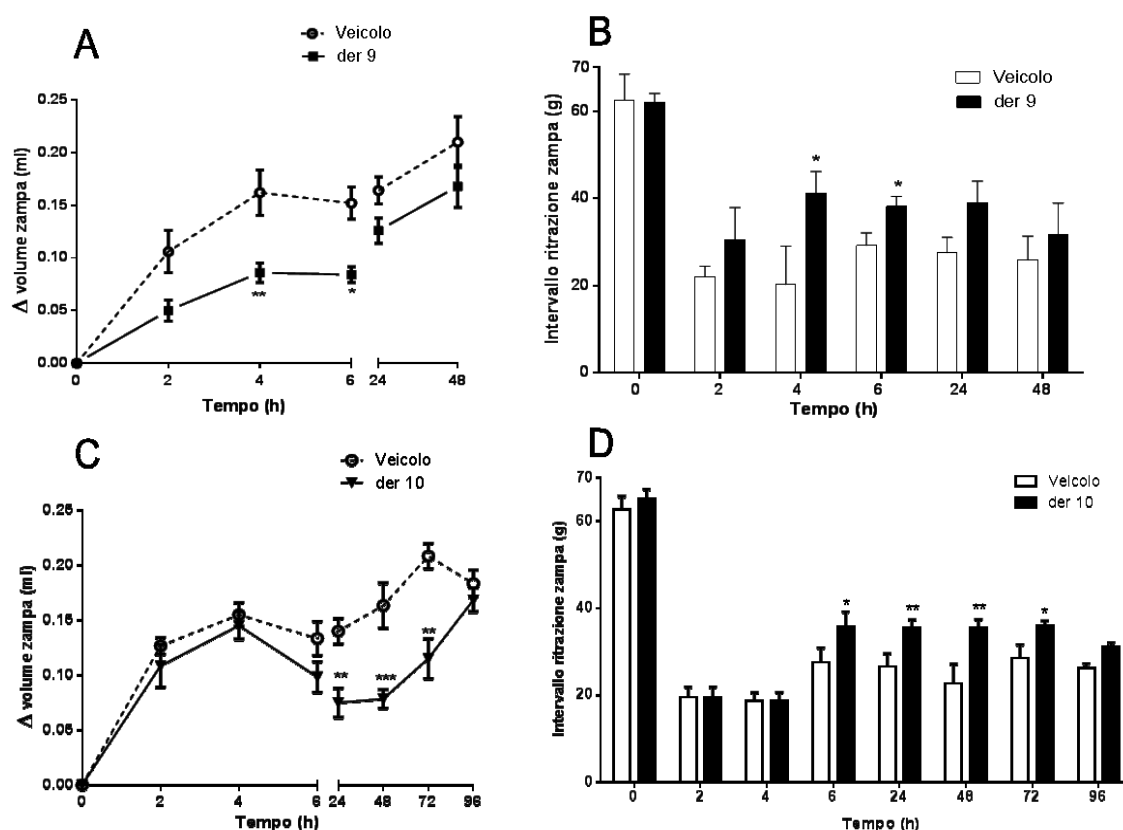


Figura 17: Effetti dell'applicazione topica del veicolo (CTR), dei profarmaci 9 e 10 sull'edema (A, C) e sull'iperalgia meccanica (B, D) I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  e \*\*\* $p<0.001$  vs CTR

#### 4.1.2 Profarmaci dermici: accumulo cutaneo

L'andamento dell'accumulo cutaneo della PEA e dei suoi profarmaci è riportato in Figura 18. Si riscontra una concentrazione costante di farmaco nelle prime 6 ore. Durante le 24h, successive alla somministrazione, la concentrazione cutanea è marcatamente ridotta e, da quel momento in poi, soltanto tracce di PEA possono essere quantificate nel tessuto. Un profilo simile può evidenziarsi per i profarmaci. Come evidenziato in figura 18A-C, fino alla sesta ora si riscontra un progressivo

accumulo di profarmaco, quindi, tra 24 e 96h la curva di concentrazione tende a decadere. Non è stato possibile monitorare l'accumulo del profarmaco **10**, a causa della mancanza di gruppi utilizzabili per la derivatizzazione pre-colonna. L'aspetto da sottolineare è che tutti i profarmaci presentano quantità di accumulo cutaneo nettamente superiori al farmaco parentale (10-15 volte) e che alcuni di essi (in particolare i derivati **6** e **7**) sono presenti, in concentrazioni relativamente elevate, anche 5 giorni dopo l'applicazione topica. Le uniche due eccezioni a questo comportamento sono registrate per i derivati **8** e **11**. Il primo presenta un profilo di accumulo superiore alla PEA, solo fino alla sesta ora. Il secondo presenta concentrazioni cutanee sovrapponibili al farmaco di origine (Figura 17A).

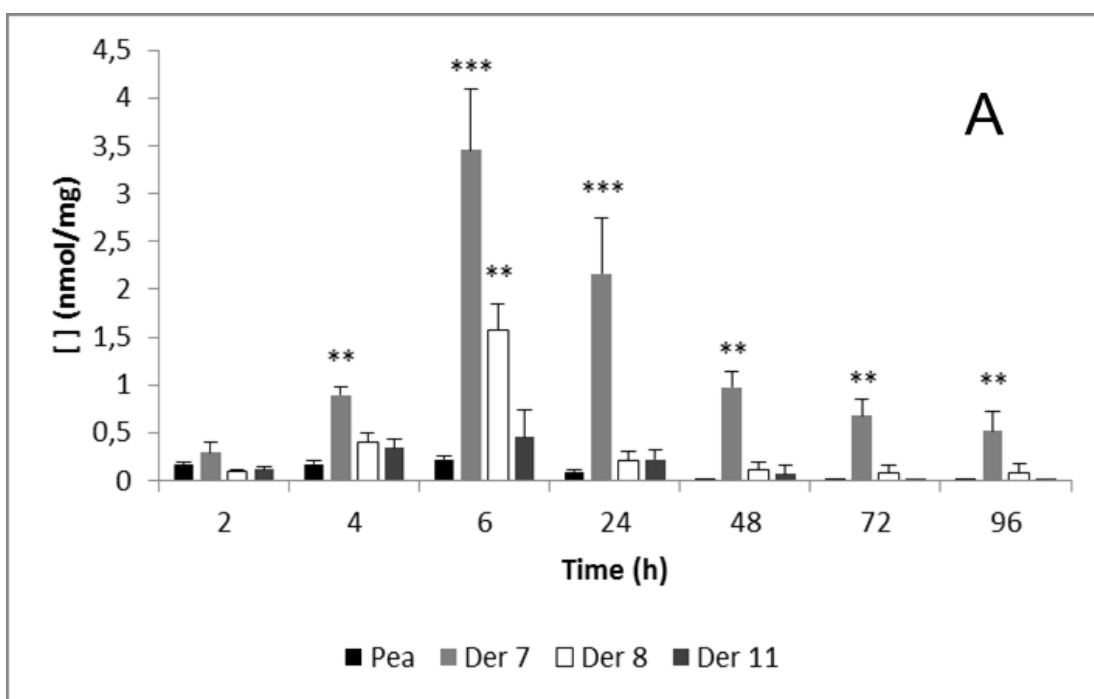


Fig. 18A: Profili comparati di accumulo cutaneo, raffrontati con PEA, per i profarmaci appartenenti al gruppo 1. Le quantità indicate sono espresse come nmol di PEA per mg di cute analizzata.  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  e \*\*\* $p<0.001$  vs PEA.



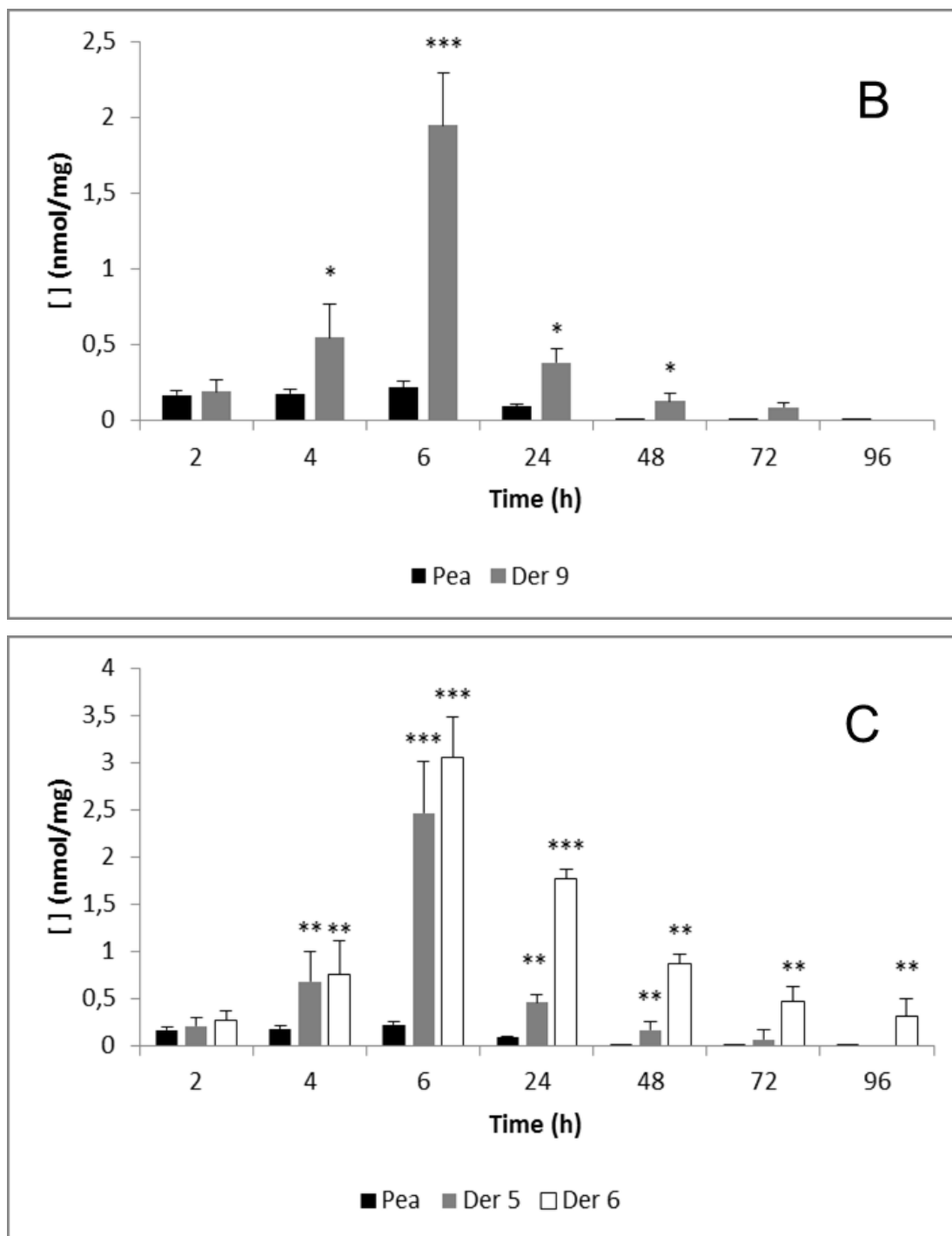


Fig. 18B-C: Profili comparati di accumulo cutaneo, raffrontati con PEA, per i profarmaci appartenenti al gruppo 2 (panel B) ed al gruppo 3 (panel C). Le quantità indicate sono espresse come nmol di PEA per mg di cute analizzata.  $\pm$  SEM (n=4). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  vs PEA.

Indipendentemente dai valori assoluti di concentrazione cutanea dei profarmaci, gli effetti farmacologici registrati, sono da imputare nel metabolismo a cui queste molecole vanno incontro e, di conseguenza, alla loro capacità di rilasciare PEA nell'intervallo temporale osservato. Le concentrazioni di farmaco derivanti sono mostrate in Figura 19, per i composti farmacologicamente attivi, mentre, in Tabella IV sono riportati i dati complessivi.

Le concentrazioni di PEA sembrano essere in buon accordo con i dati farmacologici *in vivo*. Nello specifico, i composti **7**, **8** e **11** rilasciano ridotte quantità di PEA durante tutto il time-course osservato, giustificando, in questo modo, la propria inattività.

Al contrario, il composto **9** presenta un profilo di rilascio inferiore alla PEA applicata tal quale a 2h ( $p < 0.05$ ), comparabile a 4h e 24h ( $p = 0.53$  and  $0.71$ , rispettivamente) e più elevato a 6h ( $p < 0.05$ ). Di conseguenza possono essere giustificati la rapida insorgenza e la breve durata d'azione.

Conclusioni simili possono essere tratte, osservando il rilascio di PEA dai derivati **5**, **6** e **10**. In particolare, il rilascio di PEA da questi profarmaci è sostenuto e statisticamente maggiore rispetto al farmaco applicato tal quale a partire dalla sesta ora (derivati **5** e **10**) o dalla ventiquattresima ora (**6**). Inoltre, a differenza degli altri derivati, rimarchevoli quantitativi di farmaco sono rilevati nel tessuto durante l'intero periodo di analisi. Ancora una volta, le caratteristiche dei derivati **5** e **10** sono totalmente sovrapponibili, non riscontrandosi differenze statistiche nel rilascio di PEA. Il profarmaco **6**, invece, rilascia, una quantità di PEA superiore ai suoi due omologhi a partire da 48h e fino a 96h, successive all'applicazione ( $p < 0.05$ ).

Concentrazione (nmol/mg) nel tempo							
Derivato	[ ] 2h	[ ] 4h	[ ] 6h	[ ] 24h	[ ] 48h	[ ] 72h	[ ] 96h
Pea	0,169±0,025	0,173±0,022	0,218±0,041	0,093±0,011	0,011±0,003	nd	nd
Pea da 5	0,071±0,071	0,111±0,016	0,274±0,034	0,212±0,057	0,174±0,036	0,139±0,066	0,051±0,023
Pea da 6	0,048±0,027	0,076±0,012	0,073±0,054	0,312±0,077	0,343±0,046	0,268±0,046	0,141±0,036
Pea da 7	nd	nd	0,093±0,044	0,083±0,060	0,034±0,006	0,028±0,005	0,023±0,036
Pea da 8	0,012±0,011	0,054±0,014	0,105±0,025	0,088±0,030	0,027±0,016	nd	nd
Pea da 9	0,115±0,041	0,235±0,029	0,301±0,047	0,106±0,031	0,009±0,003	nd	nd
Pea da 10	0,062±0,029	0,120±0,012	0,324±0,043	0,245±0,067	0,216±0,045	0,147±0,042	0,062±0,025
Pea da 11	0,018±0,010	0,041±0,004	0,074±0,006	0,033±0,003	0,014±0,007	nd	nd

Tabella IV: Paragone tra le quantità di PEA rilevate nella cute e quantità rilasciate dai suoi profarmaci. Le concentrazioni sono espresse in nmol di PEA per mg di cute analizzata± SEM (n=4). Nd equivale alla non determinabilità analitica delle quantità presenti.

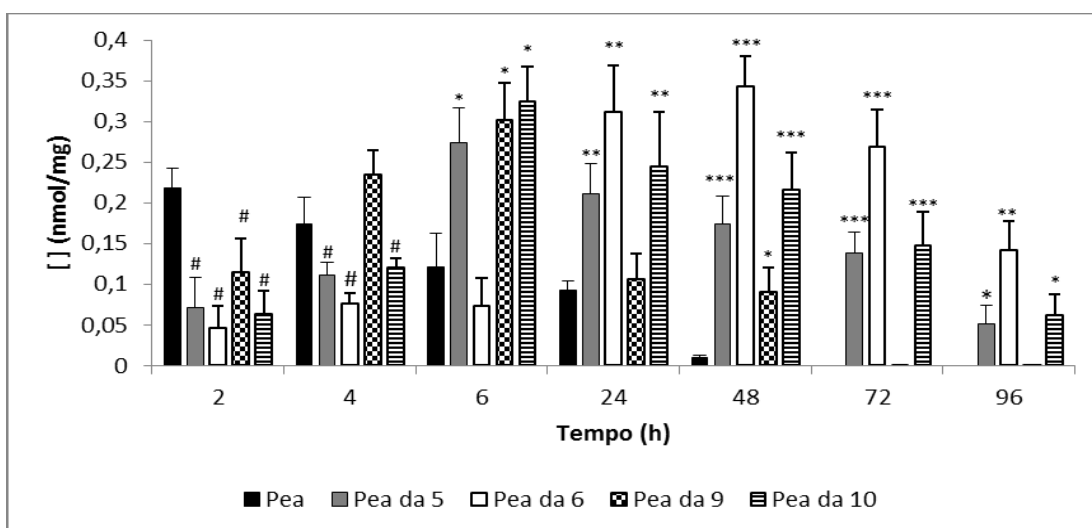


Fig. 19: Profili di accumulo comparati tra PEA e rilascio di PEA dai profarmaci 5, 6, 9 e 10. Le quantità accumulate sono espresse come nmol di PEA per mg di cute± SEM (n=4).

#  $p < 0.05$  valori di accumulo significativamente inferiori a PEA

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  valori di accumulo significativamente superiori a PEA

### ***4.1.3 Profarmaci dermici: studi di stabilità chimica ed enzimatica***

I risultati ottenuti dagli studi di stabilità sono mostrati in Figura 20.

I derivati **5**, **6** e **7**, hanno dimostrato di essere i più stabili all'idrolisi chimica in ambiente leggermente acido. La scelta di questo valore di acidità è legata al fatto che il pH cutaneo medio è stabilito in misura, proprio, di 5.5 unità. Nessuna differenza statistica è riscontrabile all'interno di questo gruppo di derivati. Dopo due giorni, circa il 20% del prodotto di partenza subisce idrolisi. E', tra l'altro, da notare che la riduzione del prodotto di partenza non corrisponde ad un equivalente rilascio di PEA. Dopo 48h solo tracce del farmaco sono rilevabili nell'ambiente di idrolisi (dati non mostrati).

La stabilità chimica è fortemente ridotta nei derivati **8** e **9**. Dopo 24h in ambiente acido, il 40% ed il 30%, rispettivamente, del prodotto di partenza è idrolizzato. La percentuale di idrolisi diventa molto più alta a 48h (65% per il derivato **8** e 56% per il derivato **9**). Come nel caso precedente la quantità di PEA rilevata in questo intervallo temporale, non corrisponde alla percentuale di profarmaco idrolizzato (dati non mostrati).

Il composto meno stabile all'idrolisi chimica si è dimostrato essere il derivato **11**, la cui concentrazione diminuisce, drasticamente, nel tempo. Dopo 48h in ambiente acido, circa l'80% del farmaco di partenza ha subito idrolisi. In questo caso, le quantità di PEA rilasciate sono compatibili con la cinetica di idrolisi del profarmaco, specialmente durante le prime 6h.

Il derivato **10** non è stato testato in questo modello di idrolisi chimica per gli stessi motivi, evidenziati in precedenza, di inattuabilità del metodo analitico adoperato

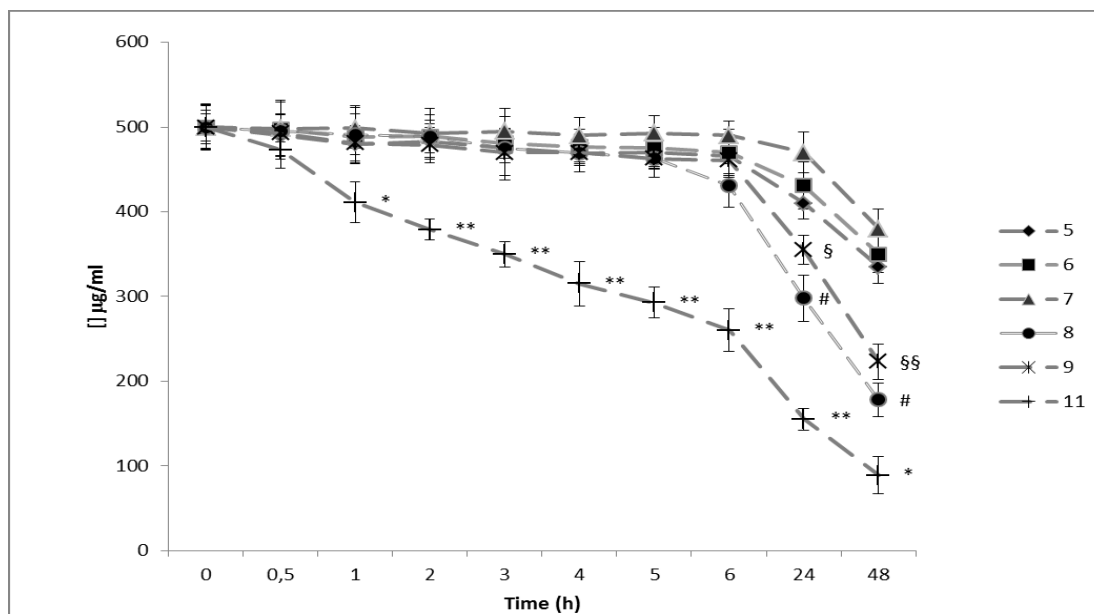


Fig. 20: Profilo di idrolisi chimica per 1 derivati sintetizzati. Le concentrazioni dei profarmaci sono espresse in mg di derivato per ml di soluzione  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Gli esperimenti sono stati eseguiti a 37°C, a pH 5.5.

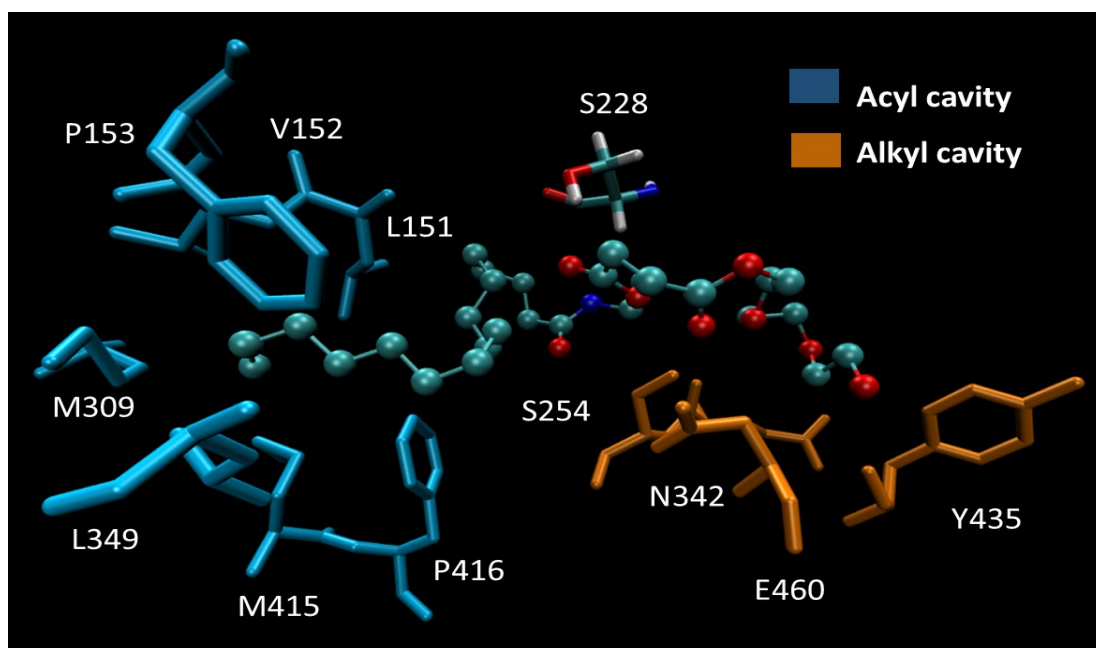
§  $p < 0.05$  concentrazioni significativamente inferiori a 5, 6 e 7

#  $p < 0.05$  concentrazioni significativamente inferiori a 9

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  concentrazioni significativamente inferiori a 8

Dal punto di vista dell'idrolisi enzimatica, invece, i risultati che emergono dalle simulazioni computazionali sono riassumibili in una buona capacità degli esteri della PEA di penetrare all'interno della cavità catalitica delle CESII. Più specificatamente, benché la CESII accomodi, preferenzialmente, esteri recanti gruppi alchilici dimensionalmente più grandi dei corrispondenti raggruppamenti acilici, gli esteri della PEA presentano promettenti proprietà chimico-fisiche per l'accesso alla cavità stessa. In particolare, la presenza di gruppi acilici di natura idrofobica (PEA) e gruppi alchilici di natura idrofilica (PEG). La posa più probabile, assunta dagli esteri, all'interno della cavità catalitica è, inoltre, quella che prevede una maggiore vicinanza del legame estere prossimale alla PEA,

con la Ser228. Questo implica che l'idrolisi enzimatica comporta il rilascio preferenziale di PEA piuttosto che della funzione pegilata (Figura 21).



*Fig. 21: Docking del derivato 5 all'interno della cavità catalitica della CESII*

Nonostante il numero ridotto di esteri simulati (7), non consenta lo sviluppo di un'equazione statisticamente significativa, esiste una buona correlazione tra i dati biologici di concentrazione tissutale di PEA ed il modello adoperato a 6h ( $r^2 = 0.67$ ), che tende a peggiorare a 24h ( $r^2 = 0.37$ ) e 48 h ( $r^2 = 0.24$ ). Questo ad indicare, potenzialmente, che la PEA rilasciata nelle prime 6h è prevalentemente legata all'idrolisi enzimatica mentre, nel periodo successivo, l'idrolisi chimica gioca un ruolo preminente. I dati raccolti consentono, inoltre di ricavare alte tre importantissime evidenze:

1) I derivati succinici, data la maggiore flessibilità, si accomodano meglio e si avvicinano di più con il gruppo estere prossimale alla Ser228

2) L'introduzione di raggruppamenti rigidi tra la PEA ed il gruppo pegilato, provoca allontanamento dalla Ser228, proporzionale alla rigidità conformazionale indotta

3) L'aumento in lunghezza della catena pegilata provoca maggiore difficoltà di ingresso nella cavità catalitica per avvicinamento eccessivo di un gruppo idrofilo alla porzione idrofoba dell'enzima

4) L'assenza di spaziatore o la sua riduzione, come nel caso del derivato **11** provoca peggiore accomodamento nella cavità catalitica della CESII

#### ***4.1.4 Profarmaci dermici: discussione***

La derivatizzazione della PEA, mediante l'impiego di funzioni pegilate, ha dimostrato di essere funzionale al superamento delle problematiche relative alla somministrazione di PEA per via topica. In particolare, i derivati **5**, **6** e **10**, si sono dimostrati in grado di prolungare enormemente la durata d'azione della molecola d'origine (fino a 4 giorni successivi), benché ne ritardino l'insorgenza. Il derivato **9**, d'altro canto, mostra un moderato effetto di prolungamento di attività (fino a 6h). Soltanto 3 dei derivati sintetizzati si sono dimostrati completamente inattivi nel modello farmacologico adoperato.

Il comportamento farmacologico è pienamente giustificato dagli studi farmacocinetici compiuti *ex vivo*, dove la corrispondenza tra l'effetto sortito ed i profili di accumulo si sovrappongono perfettamente.

I dati raccolti possono essere giustificati mediante un'analisi accurata delle caratteristiche strutturali e chimico-fisiche delle molecole analizzate, derivanti sia dallo spacer che dalla lunghezza della catena pegolata impiegati.

E' noto, ad esempio, in letteratura che la flessibilità delle molecole rappresenta un parametro essenziale nei processi di permeazione cutanea. A differenza di quanto si riteneva in precedenza, dove la dimensione assoluta della molecola rappresentava un parametro di cut-off rispetto alle capacità di permeazione, è noto, adesso, che molecole più flessibili, anche se più grandi, si adattano meglio ai cammini di permeazione consentiti, garantendosi, di conseguenza, maggiore capacità di accumulo cutaneo. E' dimostrata, ad esempio la capacità di macromolecole flessibili di attraversare la cute, anche rispetto a piccole molecole di tipo eterociclico conformazionalmente ristrette [100-103]. Da questo punto di vista, è giustificata la maggiore capacità di permeazione dei derivati **5**, **6**, **7** e **10**, rispetto ai composti **8** e **9**, li dove lo spaziatore succinico è irrigidito dalla presenza di un doppio legame o di un raggruppamento fenilico. Le distanze tra il farmaco e la funzione pegolata restano analoghe, ma il ripiegamento della molecola e la sua tendenza ad adattarsi ai tortuosi percorsi della via intercellulare o transfollicolare restano maggiori in presenza di uno spaziatore succinico.

Discorso analogo può essere fatto in funzione dei dati di idrolisi, sia chimica che enzimatica. Come dimostrato dai saggi di docking, i derivati recanti uno spaziatore succinico tendono ad adattarsi meglio al sito catalitico delle CESII, posizionandosi in modo da avvicinare al residuo catalitico della Ser 228 il raggruppamento estere più vicino alla PEA. Questo ne giustifica una maggiore capacità di rilascio della PEA nel tempo, che associata alla maggiore capacità di permeazione li rende più efficaci



rispetto agli altri analoghi sintetizzati. Si giustifica, in questo modo, anche l'assenza di attività registrata per il derivato **7**, rispetto agli altri, chimicamente omogenei. Questo profarmaco, infatti, ha un'ottima capacità di accumulo cutaneo a cui si associa, di contro, una fortissima stabilità all'idrolisi chimica e, soprattutto, enzimatica. La scarsa capacità di rilasciare PEA è giustificabile in funzione di un allungamento eccessivo della catena pegilata che va ad impattare la regione idrofobica del sito catalitico delle CESII, sfavorendo il corretto posizionamento del profarmaco al di sotto della Ser228.

L'idrolisi chimica, infine, è un parametro utile da valutare solo in funzione di un potenziale sviluppo applicativo delle molecole sintetizzate. Quasi tutte presentano un'ottima stabilità all'idrolisi chimica, in particolare, ancora una volta, i derivati presentanti spaziatore succinico. E' stato dimostrato, inoltre, come l'idrolisi chimica ricopre un ruolo importante nella metabolizzazione dei profarmaci solo 24h dopo la somministrazione cutanea. Fino a quel momento il rilascio di farmaco è legato prevalentemente all'idrolisi enzimatica. Tra l'altro, l'idrolisi chimica investe più il gruppo estere distale che quello prossimale, rispetto alla PEA, il che significa che determina rilascio di PEG, piuttosto che di PEA. Questo discorso, oltre che collimare in maniera ideale con i profili di rilascio della PEA dai profarmaci, giustifica anche la totale inattività del derivato **11**. I carbonati sono utilizzati normalmente come gruppi spaziatori nella progettazione di profarmaci [104-106] ottenendo, spesso, risultati ottimali in termini di ottimizzazione farmacocinetica legata ad una forte capacità di rilascio del farmaco. Questa capacità è dimostrata anche in questo lavoro. Il derivato **11** è, effettivamente, quello maggiormente soggetto a idrolisi chimica, e l'unico per il quale, tale fenomeno, è associato ad un corrispondente rilascio di PEA. Il problema è evidentemente quello di non riuscire a permeare in maniera sostanziale la cute e, quindi, rilasciare la

PEA solo superficialmente, inficiandone le possibilità di azione biologica. Di rilievo, in ambito di profarmaci dermici, la dimostrazione della completa sovrapponibilità di efficacia e farmacocinetica tra i due analoghi **5** e **10**. Le due molecole differiscono, esclusivamente, per la presenza di un gruppo metilico terminale nel derivato **10**, atto a mascherare la funzione ossidrilica del gruppo dietilenglicolico, altrimenti libera nel **5**. Per lungo tempo si è discusso sul possibile meccanismo d'azione dei PEG come promotori di assorbimento cutanei e della necessità che una o entrambe le funzioni ossidriliche restino libere. I dati raccolti in questo lavoro dimostrano come sia il backbone pegilato a favorire l'assorbimento e non tanto la presenza di terminali ossidrilati [107, 108].

Complessivamente, i dati raccolti, forniscono indicazioni utilissime al fine di effettuare progettazioni future di profarmaci pegilati, basate, maggiormente, su una serie di relazioni struttura-attività, piuttosto che sull'impiego pedissequo queste molecole.

## 4.2 NLC

### *4.2.1 NLC: Analisi dimensionale e potenziale zeta*

Le materie prime impiegate per la formulazione dei carrier oggetto di questo studio sono state selezionate dopo un attento screening di numerosi eccipienti comunemente utilizzati per la preparazione di NLC. Il Compritol 888 ATO (gliceride dell'acido beenico) è risultato presentare le migliori caratteristiche in termini di solubilità e di affinità nei confronti di PEA. I sistemi NLC formulati presentano dimensioni dell'ordine di nanometri, sono inoltre caratterizzati da una buona omogeneità, come si evince dai valori di PDI riportati in Tabella V, e da una notevole stabilità nel tempo, come evidenziato dai valori di potenziale zeta. I risultati ottenuti, in termini dimensionali, per le NLC sono riconducibili a scelte formulative e al processo di produzione adottato. Dai valori di potenziale zeta emerge quanto già noto dalla letteratura: i sistemi nanoparticellari a matrice lipidica e, le NLC in particolare, sono abbastanza stabili e non tendono ad aggregare.

L'agente stabilizzante scelto per i nostri studi è stato il Lutrol F68, sia perché facilmente reperibile in commercio sia perché il suo elevato valore di HLB, consente di avere un effetto stabilizzante sull'emulsione olio/acqua. Screening preliminari effettuati su questo componente, hanno dimostrato che la concentrazione corrispondente ad una quantità in peso di 0,1g di questo tenside, rappresentava la migliore utilizzabile al fine di stabilizzare le formulazioni.

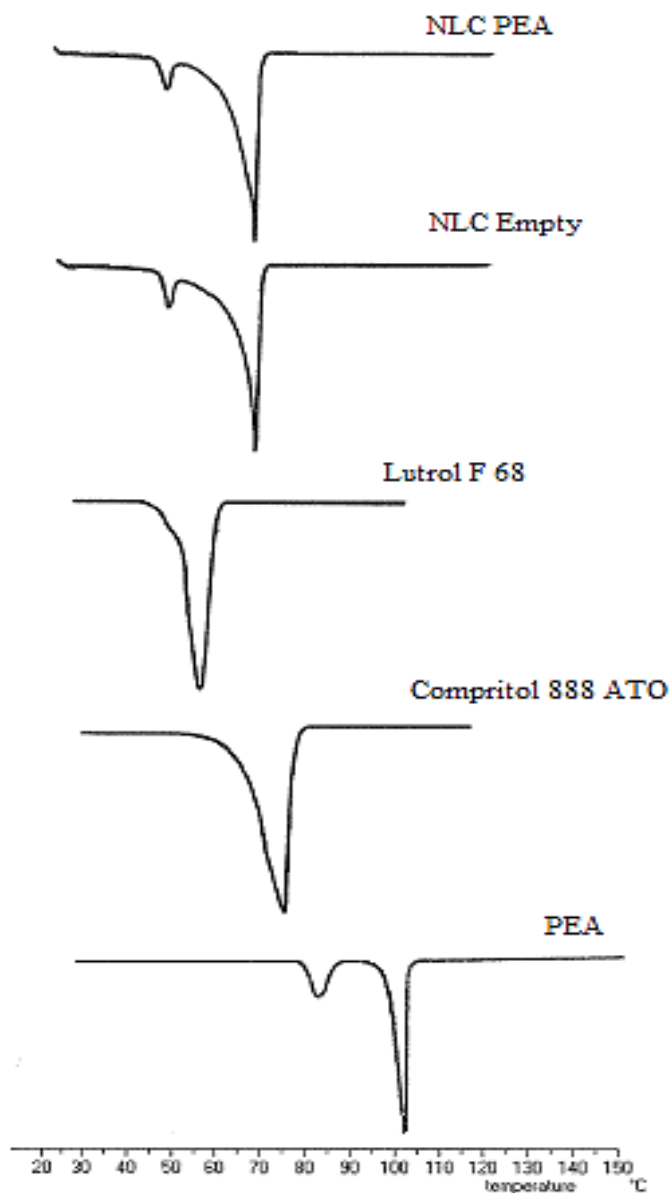
<b><i>Formulazione NLC</i></b>	<b><i>M.D. (nm)</i></b>	<b><i>PDI</i></b>	<b><i>Pz (mV)</i></b>
<i>Vuota</i>	<b>155,7</b>	<b>0,234</b>	<b>-50,7</b>
<b><i>PEA</i></b>	<b>149,5</b>	<b>0,175</b>	<b>-39,1</b>

*Tabella V: Dati di Potenziale zeta e distribuzione dimensionale misurati per le NLC vuote e per quelle contenenti PEA*

#### ***4.2.2 NLC: Analisi termocalorimetrica e morfologica***

I risultati ottenuti dagli esperimenti di DSC sono mostrati nelle Figure 21 e 22.

Come si evince dal termogramma, il lipide puro ha un punto di fusione intorno ai 75°C. Le curve di riscaldamento delle NLC cariche e non cariche differiscono molto da quelle del lipide puro. Il punto di fusione del tensioattivo sia nella NLC vuota che carica è osservato a valori leggermente più bassi rispetto al Lutrol F68 puro (shift del melting point). Questi dati, consentono di evidenziare che la struttura cristallina del Compritol 888 ATO è stata modificata dalla formulazione in NLC, con conseguente formazione di una nuova fase caratterizzata da un ordine termodinamico minore [109]. Questo è dovuto all'interazione del lipide con le altre componenti del sistema. Se la fase lipidica non si fosse integrata nel sistema, il termogramma avrebbe mostrato la presenza di differenti picchi, ognuno dei quali corrispondente ad una sostanza pura, ed isolata dal resto dei componenti della matrice (Figura 22).

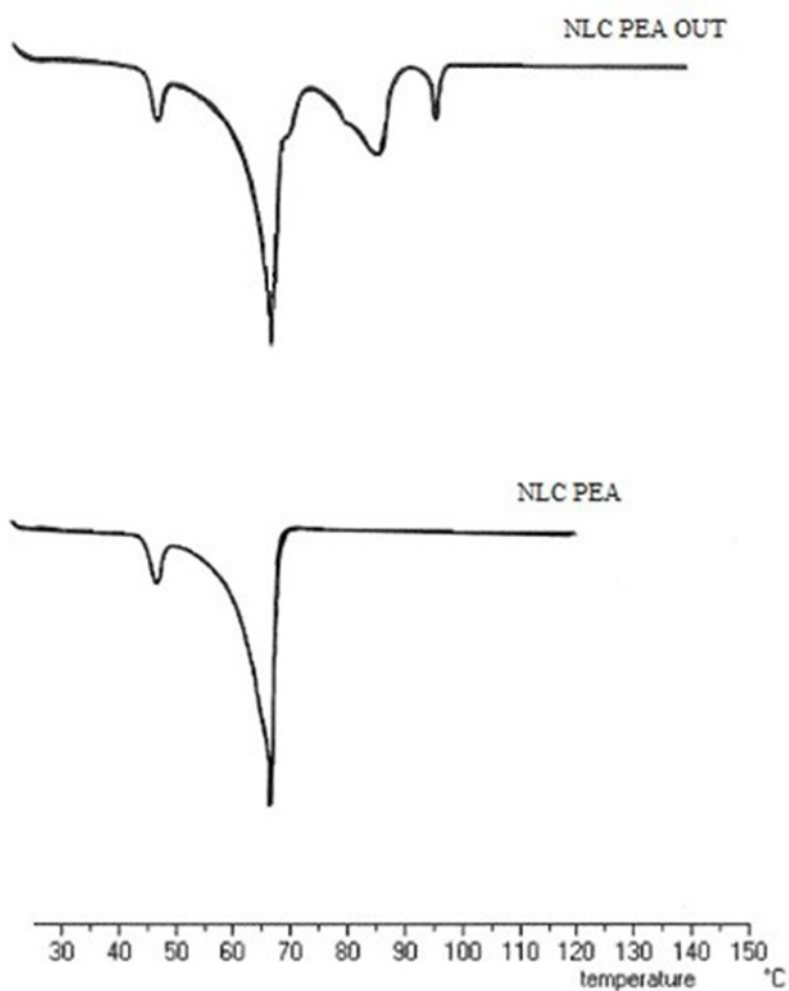


*Fig. 22: Termogramma DSC delle materie prime adoperate per la formulazione e delle NLC vuote, rispetto alle NLC caricate con PEA*

Il punto di fusione della palmitoiletanolamide è di 103°C. La curva di riscaldamento delle NLC cariche differisce da quella della palmitoiletanolamide pura: anche in questo caso si è verificato uno shift del

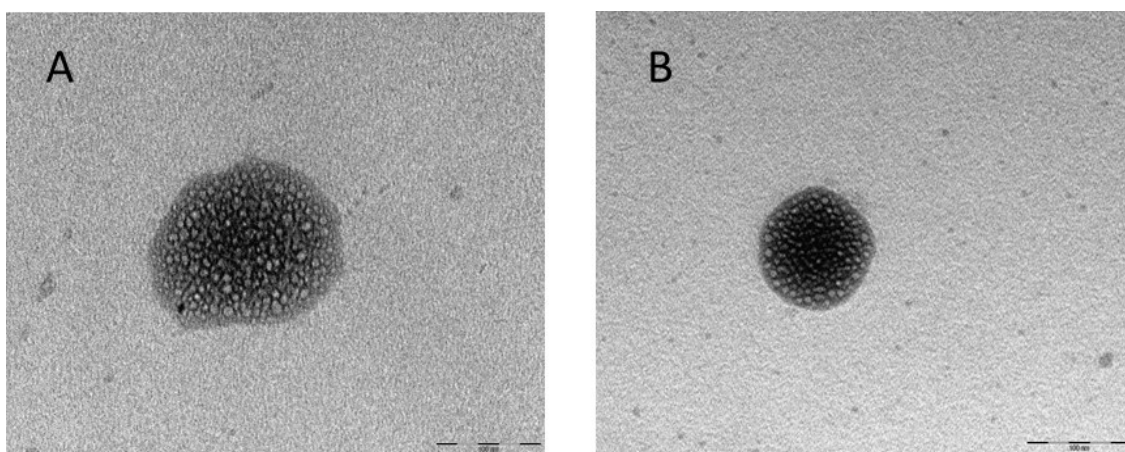
melting point, che conferma l'integrazione della PEA nel sistema lipidico nanoparticellare.

Un'ulteriore conferma dell'avvenuta inclusione dell'attivo nel sistema nanoparticellare è fornita dal confronto delle curve di calorimetria tra il sistema caricato con PEA (NLC PEA) e quello in cui l'attivo è adsorbito in superficie piuttosto che incluso (NLC PEA OUT), come mostrato dalla figura 23.



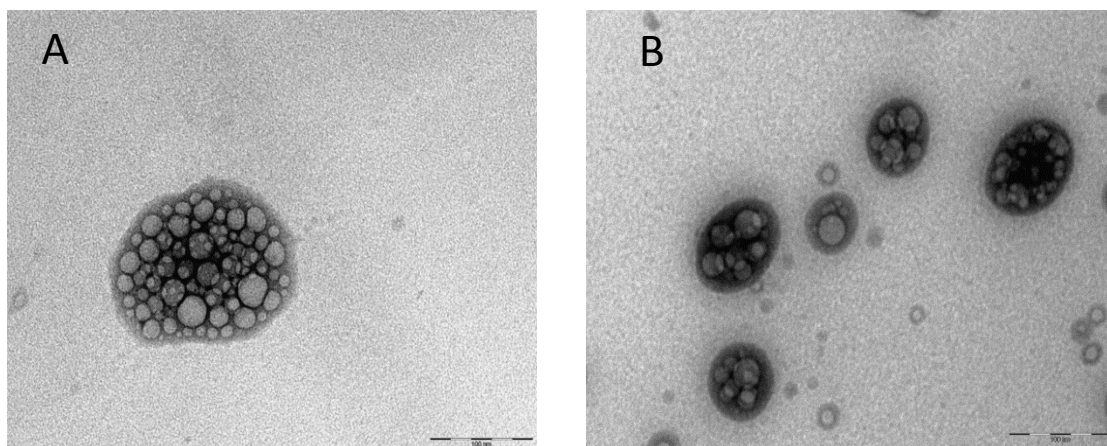
*Fig. 23: Termogramma DSC delle NLC cariche di PEA (NLC PEA) e delle NLC con PEA adsorbita all'esterno (NLC PEA OUT)*

Benché gli studi DSC confermassero i dati da attesi, attestando l'inglobamento di PEA all'interno delle nanostrutture lipidiche, restava da dimostrare l'aspetto morfologico delle nanoparticelle, al fine di confermare i dati dimensionali e verificare la reale esistenza di compartimenti interni di minori dimensioni. Per questo motivo sono stati effettuati i saggi al TEM, i cui risultati sono mostrati nelle Figure 23 e 24. Da una prima analisi a basso ingrandimento, le fotografie delle NLC ottenute al TEM mostrano particelle con dimensioni compatibili con quelle stimate attraverso spettroscopia di fotocorrelazione. A tali ingrandimenti non è stato possibile osservare, in maniera evidentissima, tutti i particolari della struttura interna (Figura 24A e B).



*Figura 24: TEM a basso ingrandimento delle NLC vuote (panel A) e delle NLC caricate con PEA (Panel B)*

Aumentando l'ingrandimento fino ad arrivare al massimo consentito dallo strumento (180.000 X) è stato possibile invece evidenziare, anche in maniera abbastanza netta, la presenza dei nano-compartimenti di olio, da sempre ipotizzati ma mai evidenziati in modo così chiaro. Come si può osservare dalla Figura 25 la presenza di olio disperso sotto forma goccioline di pochi nanometri all'interno della matrice lipidica solida è chiara ed evidente in più campi.



*Figura 25: TEM ad alto ingrandimento delle NLC vuote (panel A) e delle NLC caricate con PEA (Panel B)*

#### ***4.2.3 NLC: Permeazioni cutanee***

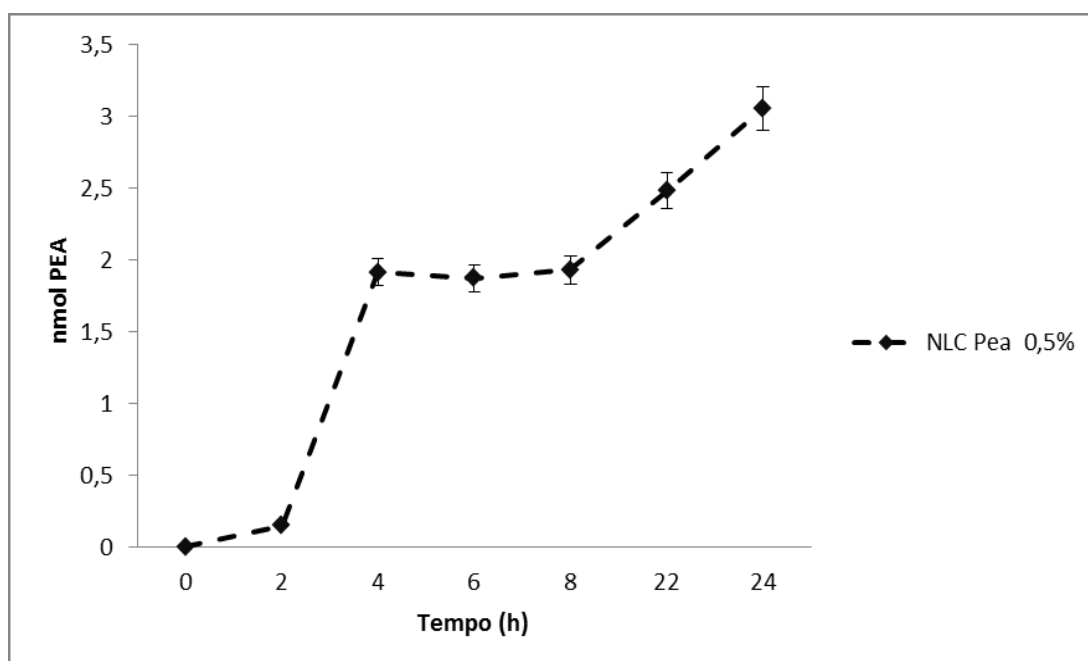
A differenza dei profarmaci della PEA, nell'impossibilità di procedere ad un'applicazione topica delle NLC, come precedentemente spiegato, i saggi di permeazione cutanea sono stati effettuati mediante l'uso delle membrane SCE e delle celle di diffusione verticale tipo-Franz.

Tre tipi di formulazione sono state testate:

- 1) NLC contenenti PEA
- 2) NLC con PEA esterna
- 3) Una soluzione etanolica allo 0,5% (p/v) in PEA



I risultati ottenuti sono mostrati in Figura 26



*Fig. 26: Cinetica di passaggio attraverso membrane SCE delle NLC formulate. I valori sono espressi in nmol di PEA  $\pm$  S.E.M. I livelli di PEA derivanti dalla permeazione delle NLC con PEA all'esterno e dalla soluzione idroalcolica erano al di sotto del limite di rivelabilità del metodo analitico adoperato*

Come è possibile osservare dalla figura soltanto le NLC contenenti PEA si sono dimostrate in grado di favorire l'attraversamento delle membrane strato corneo-epidermide. Sia le NLC con PEA adsorbita esternamente, che la soluzione idroalcolica non garantiscono passaggio misurabile del farmaco. Indipendentemente dal fatto che la non rilevabilità di PEA, in questi ultimi due casi, possa essere dovuta ad un limite oggettivo del metodo impiegato, presentante un limite di quantificazione (LOQ) eccessivamente elevato per le grandezze in gioco, risulta evidente, quanto meno, che le NLC contenenti PEA sono in grado di favorire un forte incremento nella farmacocinetica di attraversamento cutaneo del farmaco.

#### ***4.2.4 NLC: Saggi farmacologici***

I risultati ottenuti dai saggi farmacologici sulle NLC sono mostrati in Figura 26. Anche in questo caso, si può notare come la somministrazione di carragenina provoca un marcato aumento del volume della zampa (Figura 27A), ed una forte diminuzione dell'intervallo di ritrazione della zampa rispetto al tempo zero (Figura 27 B), in presenza del solo veicolo, così come in presenza delle NLC vuote. Non ci sono differenze statistiche tra i due gruppi, nei saggi farmacologici effettuati, il che esclude l'influenza dei componenti la formulazione nell'attività farmacologica dei nanocarriers.

La PEA in soluzione allo 0.5%, somministrata per iniezione subplantare, invece, mostra una marcata riduzione dell'edema e un aumento degli intervalli di ritrazione della zampa. L'attività farmacologica è, però, ancora una volta temporalmente confinata, esplicandosi tra 1h e 3h successive alla somministrazione.

Le NLC, dall'altro lato, dimostrano efficacia terapeutica paragonabile alla PEA, sia dal punto di vista dell'infiammazione, sia dal punto di vista dell'iperalgesia meccanica, con una differenza fondamentale: l'insorgenza di azione è rallentata (6h) e la durata d'azione prolungata (24h). Tra le 24h e le 48h l'attività delle NLC svanisce completamente.

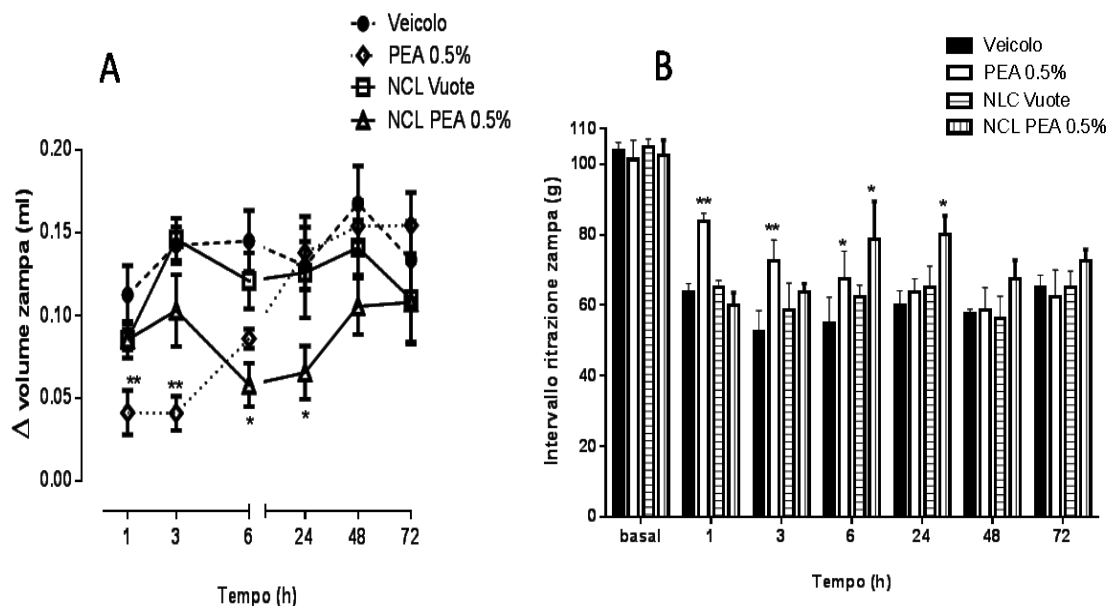


Fig. 27: Effetti dell'applicazione topica del veicolo (CTR), della soluzione di PEA allo 0.5%, delle NLC vuote e delle NLC contenenti PEA sull'edema (panel A) e sull'iperalgesia meccanica (B). I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  e \*\*\* $p<0.001$  vs CTR

#### 4.2.5 NLC: Discussione

Le NLC formulate si sono dimostrate stabili, con una ridotta ed accettabile dispersione dimensionale e morfologicamente strutturate secondo le attese. I saggi calorimetrici, il calcolo del potenziale zeta e l'analisi dimensionale hanno dimostrato questi assunti.

Un valore particolare deriva, però, dall'analisi morfologica via TEM effettuata in questo studio. L'uso del TEM, come strumento di valutazione morfologica delle NLC è ampiamente diffuso ed è considerato una pratica standard [66, 110]. Lo scopo dell'analisi TEM è solitamente quello di verificare le indicazioni dimensionali derivanti dall'analisi mediante z-sizer. Difficilmente si riescono ad ottenere indicazioni ulteriori. In tutti i

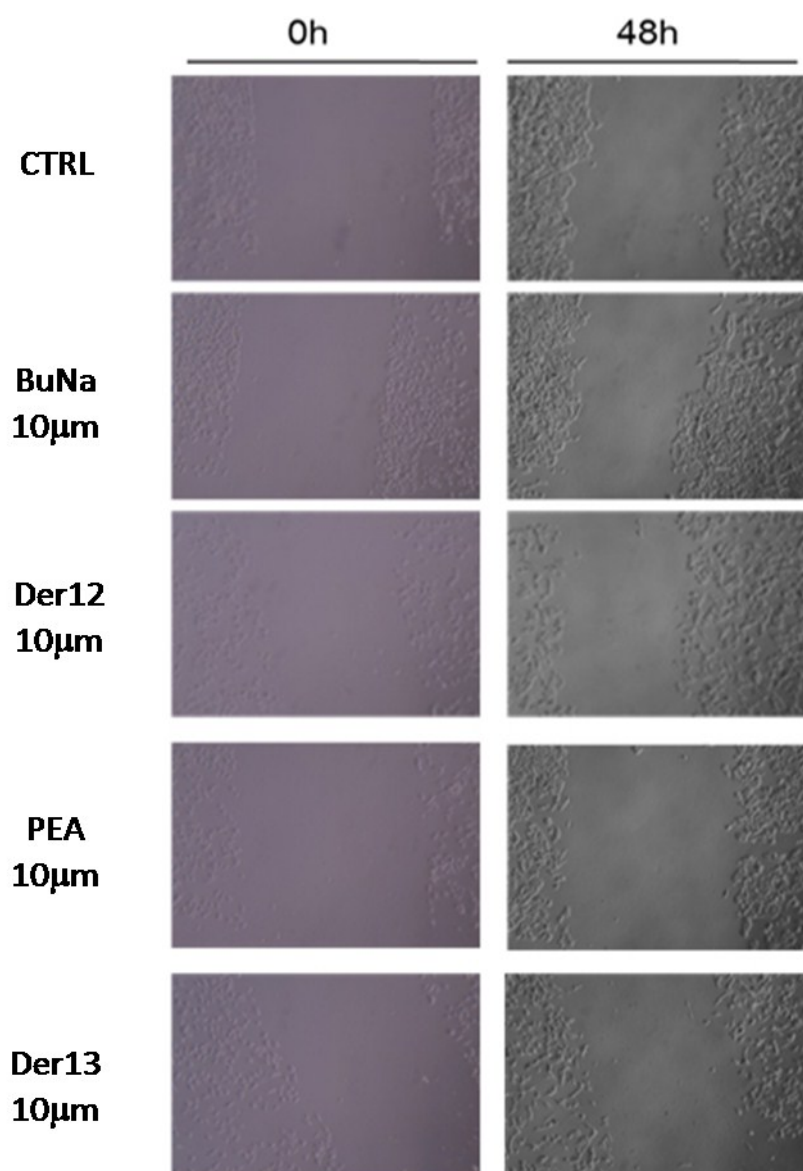
lavori relativi alle nanoparticelle ed alle NLC, in particolare, la presenza di nano-compartimenti oleosi, dispersi in una fase lipidica solida, era stata dimostrata, finora, mediante metodi “indiretti” e piuttosto laboriosi [111-113]. Per la prima volta, attraverso una tecnica microscopica, per quanto accurata, questa presenza è palesemente dimostrata. E’ possibile che un approccio diverso all’analisi TEM abbia favorito questo inatteso sviluppo. In particolare, è da notare come, nella Figura 24, sia possibile osservare bene i compartimenti in particelle di dimensioni ridotte ( $\leq 100$  nm). Lo stesso tipo di osservazione non è garantito, nel momento in cui si passa all’analisi di particelle di dimensioni maggiori. E’ probabile che il tentativo di osservare le particelle di dimensioni maggiori, nell’ipotesi che proprio in queste fosse più facilmente rilevabile la presenza dei nano-compartimenti, abbia determinato la difficoltà ad osservarli. Le particelle più piccole, infatti, sono, nel complesso, meno elettrondense e presentano uno spessore ridotto, che consente un’osservazione più accurata delle strutture interne, rispetto alle particelle di dimensioni maggiori, più elettrondense e con spessori più elevati.

Altro aspetto, direttamente legato a questo, è rappresentato dai dati di rilascio e farmacologici ottenuti sulle NLC. E’ stato dimostrato come, indipendentemente dalla sensibilità più o meno alta, del metodo analitico adoperato, le NLC caricate con PEA favoriscono il passaggio delle membrane SCE, che non avviene, o avviene in misura estremamente ridotta nel caso delle NLC caricate esternamente con PEA e nel caso della soluzione idroalcolica di PEA. Come ci si attendeva, anche dai dati presenti in letteratura [66, 67], le NLC svolgono un ruolo di promotori di assorbimento rispetto al farmaco. Questo effetto è tanto più evidente quanto più la molecola di interesse presenta problemi di solubilità in ambiente acquoso e di eccessiva lipofilia, come, oggettivamente, avviene nel caso della PEA. Tant’è vero che la soluzione idroalcolica allo 0.5% di PEA

praticamente non permea le membrane SCE. E' evidente dai dati ricavati che l'adesione cutanea, ed il conseguente effetto occlusivo, unite alle dimensioni ridotte delle NLC ed al loro effetto carrier, garantiscono un enorme incremento di penetrazione cutanea della PEA. A questo si associa un meccanismo di rilascio graduale del farmaco, in grado di favorire un effetto long-acting, in maniera analoga a quanto già visto nel caso dei profarmaci. Come rilevato dai saggi farmacologici, le NLC contenenti PEA rallentano l'insorgenza dell'azione fino a 6h, per prostrarla, almeno, fino a 24h. La sola PEA, nelle medesime condizioni sperimentali, ha un'azione immediata, ma estremamente breve, limitata alle prime 3h successive alla somministrazione. Resta inteso che il modello adoperato non è assimilabile ad un'applicazione topica vera e propria. Per i problemi già citati le NLC sono state iniettate a livello sub-plantare, ma risulta dimostrato, sicuramente un rilascio graduale del farmaco, derivante dalla progressiva fuoriuscita dai nanocompartimenti oleosi delle NLC che rallentano l'effetto biologico, ma sono in grado di prolungarlo nel tempo. Bisogna considerare, poi, che la somministrazione sub-plantare determina una maggiore velocità di degradazione e assorbimento sistemico delle NLC, rispetto alla somministrazione topica, il che vuol dire che, al di là delle evidenze raccolte, le NLC caricate con PEA potrebbero presentare ulteriore prolungamento dell'effetto locale, in un modello di somministrazione topica.

### 4.3 Co-drugs: Risultati farmacologici

I risultati ottenuti dai saggi cellulari per i co-drug **12** e **13** sono mostrati in Figura 28 e 29



*Fig. 28: Esempi di foto al microscopio degli strisci cellulari di controllo (CTRL), trattati con butirrato di sodio (BuNa), con il derivato **12**, con la PEA e con il derivato **13**, tutti a concentrazione 10 μm*

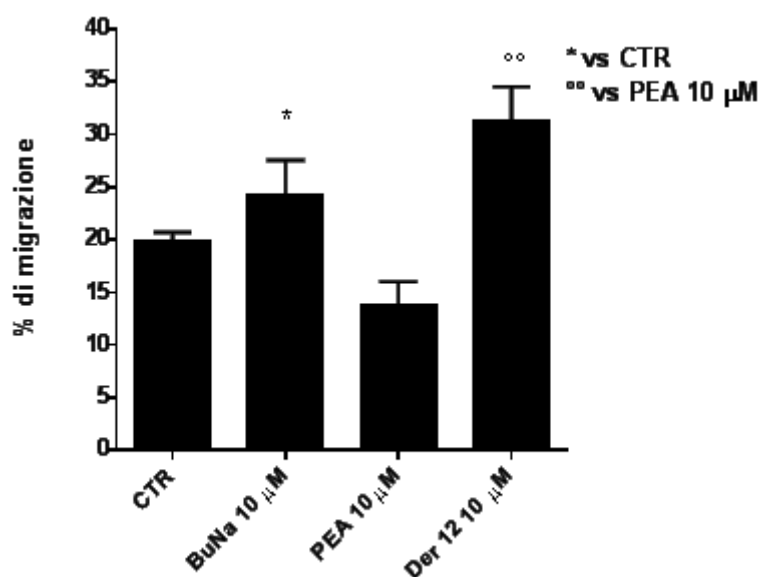


Fig. 29: Effetto wound healing dimostrato dal derivato **12**, rispetto alla PEA ed al Butirrato di sodio (BuNa) adoperati alle stesse concentrazioni

Bisogna, innanzitutto, considerare come la PEA e l'acido traumatico, sono completamente inattivi nelle condizioni sperimentali ed alle concentrazioni a cui sono stati testati. Non è strano, quindi, che il derivato **13**, abbia dimostrato efficacia nulla.

Il derivato **12**, al contrario, si è dimostrato in grado di esercitare un effetto wound healing superiore rispetto al controllo, ovviamente superiore alla PEA (data l'inattività di quest'ultima) e statisticamente superiore ( $p < 0.05$ ) anche rispetto al butirrato di sodio, il quale, invece, è molto attivo nel modello adoperato. In questo caso un leggero effetto sinergico tra i due componenti il co-drug si è manifestato.

Dei buoni risultati sono stati ottenuti anche per il derivato **14**, nel modello sperimentale in cui è stato testato. In particolare, come mostrato in Figura 29, la molecola ha determinato un effetto di tipo antiiperalgico

limitato nel tempo, con un'insorgenza piuttosto lenta ed una durata d'azione ridotta alle 24h successive alla somministrazione. Più incisiva è risultata essere, invece, l'attività antiallodinica. Gli effetti dell'allodinia da freddo sono, infatti, significativamente ridotti tra le 24h e le 48h successive all'applicazione. La liberazione del mentolo può determinare la ragione di questo comportamento diverso della molecola nei due modelli farmacologici adottati. E' noto, infatti, che il mentolo sia in grado di ridurre le reazioni allodiniche grazie all'attivazione dei recettori TRPM8.

Il paragone effettuato, per questa molecola, con il derivato **5**, dimostra, ancora una volta, la superiorità dei derivati pegilati della PEA come profarmaci ad uso dermico. Si può notare, infatti, come l'attività del derivato **5** è più marcata e, soprattutto, prolungata, nel modello di iperalgesia (Figura 30).

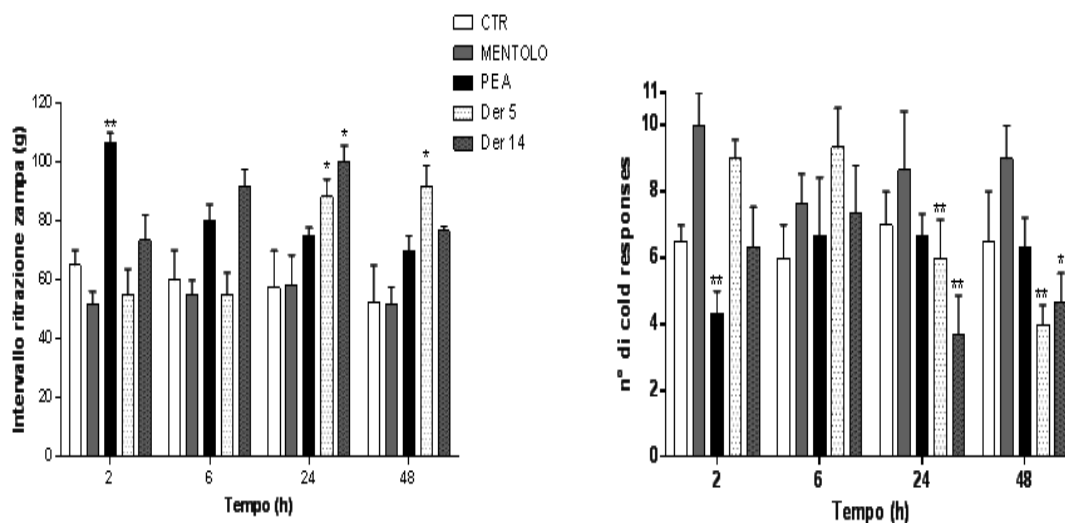


Fig. 30: Effetti dell'applicazione topica del veicolo (CTR), della soluzione di PEA allo 0.5%, delle NLC vuote e delle NLC contenenti PEA sull'edema (panel A) e sull'iperalgesia meccanica (B) I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM (n=6). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  vs CTR



## 5. Conclusioni

Dai risultati mostrati nei paragrafi precedenti e dalla loro discussione è possibile concludere che gli obiettivi prefissati nell'ambito di questo progetto di ricerca sono stati, prevalentemente raggiunti. Partendo dall'enorme potenziale farmacologico della PEA per applicazione topica, è stata evidenziata la sua brevità d'azione, determinante la necessità di multiple applicazioni giornaliere, con effetti negativi sulla compliance del paziente. In effetti, negli stessi saggi farmacologici effettuati in questo studio, è stato dimostrato come l'azione antiiperalgica ed antiinfiammatoria della molecola, hanno una durata limitata nel tempo, sia dopo somministrazione topica (4h) che dopo somministrazione sub-plantare (3h). Questo progetto di ricerca si proponeva il miglioramento delle proprietà farmacocinetiche della PEA, allo scopo di incrementarne la durata d'azione.

Sicuramente, la strategia volta alla progettazione di profarmaci dermici è risultata fruttuosa, rispetto all'obiettivo prefissato. Alcuni dei profarmaci sintetizzati hanno mostrato un prolungamento netto della durata d'azione della PEA (fino a 4 giorni successivi all'applicazione), rallentandone dall'altro lato l'insorgenza. Gli studi effettuati hanno consentito, inoltre, di trarre indicazioni relative importanti relative alle relazioni struttura-attività dei profarmaci pegilati e possono essere adoperati come riferimento per successive progettazioni. L'importanza dei risultati conseguiti è anche testimoniata dalla deposizione di una domanda di brevetto internazionale sui profarmaci pegilati della PEA da parte della Epitech srl, azienda italiana che detiene i brevetti internazionali per l'uso farmaceutico di PEA [114]. In particolare, ha colpito, un dato

farmacologico rilevato attraverso la miscelazione in quantità equimolari di PEA, derivato **5** e derivato **6**, adoperati alle stesse concentrazioni e nelle medesime condizioni già descritte nel paragrafo 4.1.1. La miscela del farmaco di origine, in associazione ai due profarmaci, è in grado di garantire insorgenza immediata d'azione e prolungamento dell'attività farmacologica fino a 4 giorni, lasciando ipotizzare una forma farmaceutica, per via topica, che possa essere applicata 2 volte in una settimana per esplicare la propria attività (Figura 31).

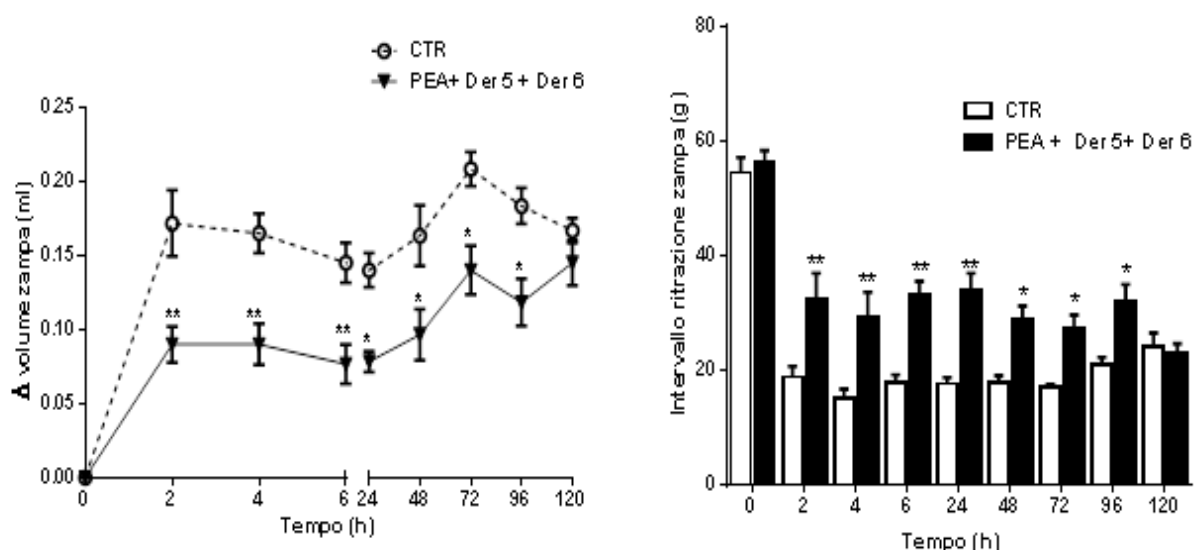


Fig. 31: Effetti dell'applicazione topica del veicolo (CTR), della miscela di PEA, derivato **5** e derivato **6** sull'edema e sull'iperlgesia meccanica. I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  e \*\*\* $p<0.001$  vs CTR

Altrettanto proficua può essere considerata la strategia di formulazione delle NLC. Anche in questo caso una palese ottimizzazione del profilo farmacocinetico è stata ottenuta, come dimostrato dai saggi di permeazione cutanea e dai saggi farmacologici. Un raffronto diretto tra le NLC ed i profarmaci dermici, che sarebbe stato interessante, dal punto di

vista scientifico, non è stato possibile. Le NLC sono state impiegate in un modello farmacologico che prevedeva la somministrazione sub-plantare, piuttosto che quella topica, per i motivi illustrati in precedenza. Sicuramente, mediante l'uso delle NLC è stato evidenziato un prolungamento dell'attività della molecola (24h) rispetto ad una somministrazione in soluzione (3h). Il risultato è paragonabile, comunque a quello dei profarmaci, da un punto di vista qualitativo. Ciò indica che, nei processi di ottimizzazione della farmacocinetica per applicazione cutanea, sia la più datata strategia del profarmaco, che la più recente delle NLC, rappresentano un'ottima strada da perseguire. Inoltre, l'aspetto importantissimo nello studio sulle NLC è rappresentato dalla dimostrazione visiva, tramite TEM, dei nanocompartimenti oleosi all'interno della matrice lipidica solida. Mai prima d'ora, in letteratura, è stato descritto un risultato del genere. Dal momento che le tecniche microscopiche adoperate sono tecniche standard, è stato ipotizzato che l'osservazione di particelle di dimensioni ridotte, minore spessore e minore elettrodensità superficiale, rappresenti la ragione dell'accuratezza di particolari delle immagini registrate. Questa ipotesi sarà verificata in una serie di studi futuri.

Risultati meno incoraggianti sono stati ottenuti nell'ambito della progettazione e sintesi dei pro-drug. Questi risultati erano, in qualche modo attendibili, considerato che la progettazione di co-drug è soggetta ad una serie di variabili molto meno identificabili e prevedibili, nonché dall'assenza delle minime linee guida, riscontrabili, invece, per i profarmaci. Bisogna, inoltre, considerare, come i risultati ottenuti per i co-drug sono da intendersi come risultati preliminari, necessitanti di approfondimenti in termini di concentrazioni adoperate, saggi di permeazione cutanea e test di idrolisi. Gli studi in questo ambito, quindi, continueranno attraverso la creazione di una serie di modelli sperimentali

che siano in grado di prevedere più rapidamente le caratteristiche che determinano i potenziali successo e fallibilità dei co-drug di PEA.

Concludendo, i derivati da noi sintetizzati e caratterizzati in questo progetto di ricerca si sono rivelati dei possibili strumenti farmacologici per mantenere in situ concentrazioni efficaci di PEA nella cute, rappresentando un'efficace alternativa ai glucocorticoidi per uso cutaneo nel controllare reazioni allergiche ed infiammazione della cute e dei suoi annessi. In questo modo si evitano l'assottigliamento della pelle e l'immuno-depressione che possono aprire la breccia a patologie infettive e virali. Inoltre, la lunga persistenza nella cute, riscontrata per i profarmaci e per le NLC, migliora la compliance dell'utilizzatore riducendo il numero di applicazioni e ottimizzando i risultati in base al rilascio costante in sede di applicazione.

## 6. Bibliografia

[1] A.F. Coburn, C.E. Graham, J. Haninger, The effect of egg yolk in diets on anaphylactic arthritis (passive Arthus phenomenon) in the guinea pig, *J Exp Med*, 100 (1954) 425-435.

[2] T. Bisogno, K. Katayama, D. Melck, N. Ueda, L. De Petrocellis, S. Yamamoto, V. Di Marzo, Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells--implications for cell proliferation and differentiation, *Eur J Biochem*, 254 (1998) 634-642.

[3] V. Di Marzo, L. De Petrocellis, N. Sepe, A. Buono, Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells, *Biochem J*, 316 ( Pt 3) (1996) 977-984.

[4] E.V. Berdyshev, P.C. Schmid, Z. Dong, H.H. Schmid, Stress-induced generation of N-acylethanolamines in mouse epidermal JB6 P+ cells, *Biochem J*, 346 Pt 2 (2000) 369-374.

[5] A. Calignano, G. La Rana, A. Giuffrida, D. Piomelli, Control of pain initiation by endogenous cannabinoids, *Nature*, 394 (1998) 277-281.

[6] N.A. Darmani, A.A. Izzo, B. Degenhardt, M. Valenti, G. Scaglione, R. Capasso, I. Sorrentini, V. Di Marzo, Involvement of the cannabimimetic compound, N-palmitoyl-ethanolamine, in inflammatory and neuropathic conditions: review of the available pre-clinical data, and first human studies, *Neuropharmacology*, 48 (2005) 1154-1163.

[7] H. Cadas, S. Gaillet, M. Beltramo, L. Venance, D. Piomelli, Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP, *J Neurosci*, 16 (1996) 3934-3942.

[8] A. Franklin, S. Parmentier-Batteur, L. Walter, D.A. Greenberg, N. Stella, Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility, *J Neurosci*, 23 (2003) 7767-7775.

[9] R.A. Puffenbarger, Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids, *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4 (2005) 625-631.

[10] J. Lo Verme, J. Fu, G. Astarita, G. La Rana, R. Russo, A. Calignano, D. Piomelli, The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide, *Mol Pharmacol*, 67 (2005) 15-19.

[11] G. D'Agostino, G. La Rana, R. Russo, O. Sasso, A. Iacono, E. Esposito, G.M. Raso, S. Cuzzocrea, J. Lo Verme, D. Piomelli, R. Meli, A. Calignano, Acute intracerebroventricular administration of palmitoylethanolamide, an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonist, modulates carrageenan-induced paw edema in mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 322 (2007) 1137-1143.

[12] B. Desvergne, W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, *Endocr Rev*, 20 (1999) 649-688.

[13] S.A. Kliewer, B.M. Forman, B. Blumberg, E.S. Ong, U. Borgmeyer, D.J. Mangelsdorf, K. Umesono, R.M. Evans, Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (1994) 7355-7359.

[14] R.T. Nolte, G.B. Wisely, S. Westin, J.E. Cobb, M.H. Lambert, R. Kurokawa, M.G. Rosenfeld, T.M. Willson, C.K. Glass, M.V. Milburn, Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , *Nature*, 395 (1998) 137-143.

[15] J. Berger, D.E. Moller, The mechanisms of action of PPARs, *Annu Rev Med*, 53 (2002) 409-435.

[16] A. Castrillo, P. Tontonoz, Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20 (2004) 455-480.

[17] P.R. Devchand, A.K. Hihi, M. Perroud, W.D. Schleuning, B.M. Spiegelman, W. Wahli, Chemical probes that differentially modulate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and BLTR, nuclear and cell surface receptors for leukotriene B(4), *J Biol Chem*, 274 (1999) 23341-23348.

[18] P. Delerive, J.C. Fruchart, B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control, *J Endocrinol*, 169 (2001) 453-459.

[19] R. Kostadinova, W. Wahli, L. Michalik, PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation, *Curr Med Chem*, 12 (2005) 2995-3009.

[20] S. Moreno, S. Farioli-Vecchioli, M.P. Ceru, Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS, *Neuroscience*, 123 (2004) 131-145.

[21] A. Benani, T. Heurtaux, P. Netter, A. Minn, Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in rat spinal cord after peripheral noxious stimulation, *Neurosci Lett*, 369 (2004) 59-63.

[22] B. Costa, S. Conti, G. Giagnoni, M. Colleoni, Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems, *Br J Pharmacol*, 137 (2002) 413-420.

[23] S. Conti, B. Costa, M. Colleoni, D. Parolaro, G. Giagnoni, Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat, *Br J Pharmacol*, 135 (2002) 181-187.

[24] M. Melis, G. Pillolla, A. Luchicchi, A.L. Muntoni, S. Yasar, S.R. Goldberg, M. Pistis, Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors, *J Neurosci*, 28 (2008) 13985-13994.

[25] D. De Filippis, A. Russo, D. De Stefano, M. Cipriano, D. Esposito, G. Grassia, R. Carnuccio, G. Russo, T. Iuvone, Palmitoylethanolamide inhibits rMCP-5 expression by regulating MITF activation in rat chronic granulomatous inflammation, *Eur J Pharmacol*, 725 (2014) 64-69.

[26] D. De Filippis, L. Luongo, M. Cipriano, E. Palazzo, M.P. Cinelli, V. de Novellis, S. Maione, T. Iuvone, Palmitoylethanolamide reduces granuloma-induced hyperalgesia by modulation of mast cell activation in rats, *Mol Pain*, 7 (2011) 3.

[27] B. Costa, F. Comelli, I. Bettoni, M. Colleoni, G. Giagnoni, The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors, *Pain*, 139 (2008) 541-550.

[28] O. Braissant, W. Wahli, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development, *Endocrinology*, 139 (1998) 2748-2754.



[29] M. Rivier, I. Safonova, P. Lebrun, C.E. Griffiths, G. Ailhaud, S. Michel, Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes, *J Invest Dermatol*, 111 (1998) 1116-1121.

[30] L. Michalik, B. Desvergne, N.S. Tan, S. Basu-Modak, P. Escher, J. Rieusset, J.M. Peters, G. Kaya, F.J. Gonzalez, J. Zakany, D. Metzger, P. Chambon, D. Duboule, W. Wahli, Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice, *J Cell Biol*, 154 (2001) 799-814.

[31] M. Westergaard, J. Henningsen, M.L. Svendsen, C. Johansen, U.B. Jensen, H.D. Schroder, I. Kratchmarova, R.K. Berge, L. Iversen, L. Bolund, K. Kragballe, K. Kristiansen, Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid, *J Invest Dermatol*, 116 (2001) 702-712.

[32] V.R. Babaev, H. Ishiguro, L. Ding, P.G. Yancey, D.E. Dove, W.J. Kovacs, C.F. Semenkovich, S. Fazio, M.F. Linton, Macrophage expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice, *Circulation*, 116 (2007) 1404-1412.

[33] M.M. Downie, D.A. Sanders, L.M. Maier, D.M. Stock, T. Kealey, Peroxisome proliferator-activated receptor and farnesoid X receptor ligands differentially regulate sebaceous differentiation in human sebaceous gland organ cultures in vitro, *Br J Dermatol*, 151 (2004) 766-775.

[34] S.E. Dunn, S.S. Ousman, R.A. Sobel, L. Zuniga, S.E. Baranzini, S. Youssef, A. Crowell, J. Loh, J. Oksenberg, L. Steinman, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha expression in T cells mediates

gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity, *J Exp Med*, 204 (2007) 321-330.

[35] L.F. Eichenfield, A. McCollum, P. Msika, The benefits of sunflower oleodistillate (SOD) in pediatric dermatology, *Pediatr Dermatol*, 26 (2009) 669-675.

[36] M.Y. Sheu, A.J. Fowler, J. Kao, M. Schmuth, K. Schoonjans, J. Auwerx, J.W. Fluhr, M.Q. Man, P.M. Elias, K.R. Feingold, Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models, *J Invest Dermatol*, 118 (2002) 94-101.

[37] S. Dubrac, A. Elentner, K. Schoonjans, J. Auwerx, M. Schmuth, Lack of IL-2 in PPAR-alpha-deficient mice triggers allergic contact dermatitis by affecting regulatory T cells, *Eur J Immunol*, 41 (2011) 1980-1991.

[38] S. Kippenberger, S.M. Loitsch, M. Grundmann-Kollmann, S. Simon, T.A. Dang, K. Hardt-Weinelt, R. Kaufmann, A. Bernd, Activators of peroxisome proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced inflammation, *J Invest Dermatol*, 117 (2001) 1430-1436.

[39] J. Fu, S. Gaetani, F. Oveisi, J. Lo Verme, A. Serrano, F. Rodriguez De Fonseca, A. Rosengarth, H. Luecke, B. Di Giacomo, G. Tarzia, D. Piomelli, Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha, *Nature*, 425 (2003) 90-93.

[40] H.H. Schmid, P.C. Schmid, V. Natarajan, The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signalling, *Chem Phys Lipids*, 80 (1996) 133-142.

[41] S. Dubrac, M. Schmuth, PPAR-alpha in cutaneous inflammation, *Dermatoendocrinol*, 3 (2011) 23-26.

[42] G. Re, R. Barbero, A. Miolo, V. Di Marzo, Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals, *Vet J*, 173 (2007) 21-30.

[43] L. Kircik, A nonsteroidal lamellar matrix cream containing palmitoylethanolamide for the treatment of atopic dermatitis, *J Drugs Dermatol*, 9 (2010) 334-338.

[44] M.B. Goodman, M.D. Elias, S. Skopit, Case Series: N-palmitoylethanolamide Cream (PEA or Mimyx®) used as an adjunct to prevent inverse psoriasis flare frequency *J Am Osteop Coll Derm*, 11 (2008) 49-50.

[45] S. Cerrato, P. Brazis, M.F. Della Valle, A. Miolo, A. Puigdemont, Inhibitory effect of topical adelmidrol on antigen-induced skin wheal and mast cell behavior in a canine model of allergic dermatitis, *BMC Vet Res*, 8 (2012) 230.

[46] J. Hadgraft, Skin, the final frontier, *Int J Pharm*, 224 (2001) 1-18.

[47] J. Hadgraft, Modulation of the barrier function of the skin, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14 Suppl 1 (2001) 72-81.

[48] P.W. Wertz, Lipids and barrier function of the skin, *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh), 208 (2000) 7-11.

[49] D.J. Moore, M.E. Rerek, Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models, *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh), 208 (2000) 16-22.

[50] J.A. Bouwstra, F.E. Dubbelaar, G.S. Gooris, M. Ponc, The lipid organisation in the skin barrier, *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh), 208 (2000) 23-30.

[51] B. Forslind, A domain mosaic model of the skin barrier, *Acta Derm Venereol*, 74 (1994) 1-6.

[52] L. Norlen, Skin barrier structure and function: the single gel phase model, *J Invest Dermatol*, 117 (2001) 830-836.

[53] L. Norlen, Skin barrier formation: the membrane folding model, *J Invest Dermatol*, 117 (2001) 823-829.

[54] J. Hadgraft, Skin deep, *Eur J Pharm Biopharm*, 58 (2004) 291-299.

[55] K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro, *Eur J Pharm Biopharm*, 52 (2001) 103-112.

[56] J. Lademann, N. Otberg, H. Richter, U. Jacobi, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, [Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances], *Hautarzt*, 54 (2003) 321-323.

[57] J. Lademann, H. Schaefer, N. Otberg, A. Teichmann, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, [Penetration of microparticles into human skin], *Hautarzt*, 55 (2004) 1117-1119.

[58] H. Schaefer, J. Lademann, The role of follicular penetration. A differential view, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14 Suppl 1 (2001) 23-27.

[59] H. Trommer, R.H. Neubert, Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review, *Skin Pharmacol Physiol*, 19 (2006) 106-121.

[60] R.B. Walker, E.W. Smith, The role of percutaneous penetration enhancers, *Adv Drug Deliv Rev*, 18 (1996) 295-301.

[61] A.C. Williams, B.W. Barry, Penetration enhancers, *Adv Drug Deliv Rev*, 56 (2004) 603-618.

[62] B.M. Magnusson, K.A. Walters, M.S. Roberts, Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement, *Adv Drug Deliv Rev*, 50 (2001) 205-227.

[63] R. Neubert, U. Schmalfuß, C. Huschka, W. Wohlrab, Recent development in the area of dermal drug application, *Pharm Ind*, 60 (1998) 149-156.

[64] M.R. Prausnitz, S. Mitragotri, R. Langer, Current status and future potential of transdermal drug delivery, *Nat Rev Drug Discov*, 3 (2004) 115-124.

[65] J. Kalbitz, R. Neubert, W. Wohlrab, [Modulation of drug penetration in the skin], *Pharmazie*, 51 (1996) 619-637.

[66] R.H. Muller, M. Radtke, S.A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv Drug Deliv Rev*, 54 Suppl 1 (2002) S131-155.

[67] J. Pardeike, A. Hommoss, R.H. Muller, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *Int J Pharm*, 366 (2009) 170-184.

[68] M. Cirri, M. Bragagni, N. Mennini, P. Mura, Development of a new delivery system consisting in "drug--in cyclodextrin--in nanostructured lipid carriers" for ketoprofen topical delivery, *Eur J Pharm Biopharm*, 80 (2012) 46-53.

[69] P. Ettmayer, G.L. Amidon, B. Clement, B. Testa, Lessons learned from marketed and investigational prodrugs, *J Med Chem*, 47 (2004) 2393-2404.

[70] V.J. Stella, Prodrugs: Some thoughts and current issues, *J Pharm Sci*, 99 (2010) 4755-4765.

[71] V.J. Stella, S. Martodihardjo, K. Terada, V.M. Rao, Some relationships between the physical properties of various 3-acyloxymethyl prodrugs of phenytoin to structure: potential in vivo performance implications, *J Pharm Sci*, 87 (1998) 1235-1241.

[72] V.J. Stella, W.N. Charman, V.H. Naringrekar, Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice?, *Drugs*, 29 (1985) 455-473.

[73] V.J. Stella, K.J. Himmelstein, Prodrugs and site-specific drug delivery, *J Med Chem*, 23 (1980) 1275-1282.

[74] B. Testa, Prodrug research: futile or fertile?, *Biochem Pharmacol*, 68 (2004) 2097-2106.

[75] E.B. Roche, Design of Biopharmaceutical Properties Through Prodrugs and Analogs, in, *American Pharmaceutical Association/Academy of Pharmaceutical Sciences*, Washington DC, 1977, pp. 455.

[76] N. Bodor, P. Buchwald, Drug targeting via retrometabolic approaches, *Pharmacol Ther*, 76 (1997) 1-27.

[77] N. Bodor, P. Buchwald, Soft drug design: general principles and recent applications, *Med Res Rev*, 20 (2000) 58-101.

[78] M.O. Hamad, P.K. Kiptoo, A.L. Stinchcomb, P.A. Crooks, Synthesis and hydrolytic behavior of two novel tripartate codrugs of naltrexone and 6beta-naltrexol with hydroxybupropion as potential alcohol abuse and smoking cessation agents, *Bioorg Med Chem*, 14 (2006) 7051-7061.

[79] P.K. Kiptoo, M.O. Hamad, P.A. Crooks, A.L. Stinchcomb, Enhancement of transdermal delivery of 6-beta-naltrexol via a codrug linked to hydroxybupropion, *J Control Release*, 113 (2006) 137-145.

[80] J. Leppanen, J. Huuskonen, T. Nevalainen, J. Gynther, H. Taipale, T. Jarvinen, Design and synthesis of a novel L-dopa-entacapone codrug, *J Med Chem*, 45 (2002) 1379-1382.

[81] C. Fruijtier-Polloth, Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products, *Toxicology*, 214 (2005) 1-38.

[82] Y. Guo, J. Luo, S. Tan, B.O. Otieno, Z. Zhang, The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery, *Eur J Pharm Sci*, 49 (2013) 175-186.

[83] F. Bonina, C. Puglia, N.A. Santagati, A. Saija, A. Tomaino, B. Tita, Oligoethylene ester derivatives of ketoprofen, naproxen and diclofenac as oral prodrugs: a pharmacological evaluation, *Pharmazie*, 57 (2002) 552-555.

[84] F.P. Bonina, M.G. Rimoli, L. Avallone, F. Barbato, M. Amato, C. Puglia, M. Ricci, P. De Caprariis, New oligoethylene ester derivatives of 5-iodo-2'-deoxyuridine as dermal prodrugs: synthesis, physicochemical properties, and skin permeation studies, *J Pharm Sci*, 91 (2002) 171-179.

[85] C. Puglia, C. Ostacolo, A. Sacchi, S. Laneri, F. Bonina, In-vitro and in-vivo evaluation of oligoethylene esters as dermal prodrugs of 18beta-glycyrrhetic acid, *J Pharm Pharmacol*, 58 (2006) 311-319.

[86] F. Della Valle, S. Lorenzi, G. Marcolongo, Trans and cis traumatic acid salts having cicatrizant activity associated to bacteriostatic, antiviral, antibiotic or antifungal activity, in, *Google Patents*, 1996.

[87] X. Ma, P.X. Fan, L.S. Li, S.Y. Qiao, G.L. Zhang, D.F. Li, Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions, *J Anim Sci*, 90 Suppl 4 (2012) 266-268.

[88] D.C. Zimmerman, C.A. Coudron, Identification of Traumatins, a Wound Hormone, as 12-Oxo-trans-10-dodecenoic Acid, *Plant Physiol*, 63 (1979) 536-541.

[89] B. Liu, L. Fan, S. Balakrishna, A. Sui, J.B. Morris, S.E. Jordt, TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain, *Pain*, 154 (2013) 2169-2177.

[90] C. Ostacolo, P. Ambrosino, R. Russo, M. Lo Monte, M.V. Soldovieri, S. Laneri, A. Sacchi, G. Vistoli, M. Taglialatela, A. Calignano,



Isoxazole derivatives as potent transient receptor potential melastatin type 8 (TRPM8) agonists, *Eur J Med Chem*, 69 (2013) 659-669.

[91] R.M. Varman, S. Singh, Investigation of effects of terpene skin penetration enhancers on stability and biological activity of lysozyme, *AAPS PharmSciTech*, 13 (2012) 1084-1090.

[92] D.M. Lambert, F.G. DiPaolo, P. Sonveaux, M. Kanyonyo, S.J. Govaerts, E. Hermans, J. Bueb, N.M. Delzenne, E.J. Tschirhart, Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB(2) cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors, *Biochim Biophys Acta*, 1440 (1999) 266-274.

[93] M. Cappelezzo, C.A. Capellari, S.H. Pezzin, L.A. Coelho, Stokes-Einstein relation for pure simple fluids, *J Chem Phys*, 126 (2007) 224516.

[94] T. Takagi, Electrophoretic light scattering, *Electrophoresis*, 14 (1993) 1255-1256.

[95] J.S. Almeida, F. Lima, S.D. Ros, L.O. Bulhoes, L.M. de Carvalho, R.C. Beck, Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies, *Nanoscale Res Lett*, 5 (2010) 1603-1610.

[96] G. Astarita, D. Piomelli, Lipidomic analysis of endocannabinoid metabolism in biological samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 2755-2767.

[97] C. Ostacolo, F. Marra, S. Laneri, A. Sacchi, S. Nicoli, C. Padula, P. Santi, Alpha-tocopherol pro-vitamins: synthesis, hydrolysis and accumulation in rabbit ear skin, *J Control Release*, 99 (2004) 403-413.

[98] Q.G. Zhu, J.H. Hu, H.W. Zeng, [Stereoselectivity of skin carboxylesterase metabolism], Yao Xue Xue Bao, 40 (2005) 322-326.

[99] B. Yagen, S. Burstein, Novel and sensitive method for the detection of anandamide by the use of its dansyl derivative, J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 740 (2000) 93-99.

[100] G. Cevc, A. Schatzlein, H. Richardsen, Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements, Biochim Biophys Acta, 1564 (2002) 21-30.

[101] M. Kong, X.G. Chen, D.K. Kweon, H.J. Park, Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier, Carbohydrate Polymers, 86 (2011) 837-843.

[102] B.G. Auner, C. Valenta, J. Hadgraft, Influence of lipophilic counter-ions in combination with phloretin and 6-ketocholestanol on the skin permeation of 5-aminolevulinic acid, Int J Pharm, 255 (2003) 109-116.

[103] M.E.M.J. van Kuijk-Meuwissen, H.E. Junginger, J.A. Bouwstra, Interactions between liposomes and human skin in vitro, a confocal laser scanning microscopy study, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1371 (1998) 31-39.

[104] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Jarvinen, J. Savolainen, Prodrugs: design and clinical applications, Nat Rev Drug Discov, 7 (2008) 255-270.

[105] D.D. N'Da, J.C. Breytenbach, L.J. Legoabe, J.W. Breytenbach, Synthesis and in vitro transdermal penetration of methoxypoly(ethylene glycol) carbonate derivatives of stavudine, Med Chem, 5 (2009) 497-506.

[106] D. N'Da D, J.C. Breytenbach, Synthesis of methoxypoly(ethylene glycol) carbonate prodrugs of zidovudine and penetration through human skin in vitro, *J Pharm Pharmacol*, 61 (2009) 721-731.

[107] J. Liaw, J.R. Robinson, The effect of polyethylene glycol molecular weight on corneal transport and the related influence of penetration enhancers, *International Journal of Pharmaceutics*, 88 (1992) 125-140.

[108] B.J. Aungst, N. J. Rogers, E. Shefter, Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides, *International Journal of Pharmaceutics*, 33 (1986) 225-234.

[109] B. Siekmann, K. Westesen, Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3 (1994) 159-175.

[110] J.B. Hall, M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, S.E. McNeil, Characterization of nanoparticles for therapeutics, *Nanomedicine (Lond)*, 2 (2007) 789-803.

[111] J. Varshosaz, S. Eskandari, M. Tabakhian, Production and optimization of valproic acid nanostructured lipid carriers by the Taguchi design, *Pharm Dev Technol*, 15 (2010) 89-96.

[112] H. Ali, K. El-Sayed, P.W. Sylvester, S. Nazzal, Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: evidence studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy ((<sup>1</sup>H) NMR), *Colloids Surf B Biointerfaces*, 77 (2010) 286-297.

[113] K. Jores, W. Mehnert, M. Drechsler, H. Bunjes, C. Johann, K. Mader, Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, *J Control Release*, 95 (2004) 217-227.

[114] A. Calignano, G. D'Agostino, S. Laneri, R. Meli, C. Ostacolo, R. Russo, A. Sacchi, D. Tronino, F. Della Valle, M.F. Della Valle, G. Marcolongo, Polyethylene glycol derivatives of Palmitoylethanolamide and analogous acylethanolamides, Us patent application number 14/103,463, (2014).

## 7. Indice

Capitoli	Sottocapitoli	Pagine
<b>Capitolo 1: Introduzione</b>		<b>1</b>
	<i>1.1 La palmitoiletanolamide</i>	1
	<i>1.2 Biosintesi ed inattivazione</i>	2
	<i>1.3 Recettore attivato della proliferazione perossisomiale (PPAR-<math>\alpha</math>)</i>	3
	<i>1.4 Proprietà antiinfiammatorie cutanee della PEA</i>	6
	<i>1.5 Evoluzione nell'uso farmaceutico di PEA: dalla somministrazione sistemica alla via topica</i>	8
	<i>1.6 Somministrazione topica di attivi farmaceutici: metodi di modulazione della penetrazione cutanea.</i>	11
	<i>1.7 Gli enhancer di penetrazione cutanea</i>	17
	<i>1.8 I nanocarrier lipidici come sistemi di veicolazione di attivi per via topica</i>	19
	<i>1.9 I profarmaci dermici: significato farmaceutico e sviluppi applicativi</i>	26
<b>Capitolo 2: Obiettivi del lavoro</b>		<b>32</b>
<b>Capitolo 3: Materiali e metodi</b>		<b>36</b>
	<i>3.1 Sintesi e caratterizzazione di PEA e dei suoi profarmaci</i>	36
	<i>3.1.1 Sintesi della N-Palmitoiletanolamide (1)</i>	36
	<i>3.1.2 Procedura generale per la sintesi degli oligoetilenesteri della PEA</i>	36
	<i>3.1.3 Sintesi di acido 4-oxo-4-(2-palmitamidoetossi) butanoico (2) – acido (E)-4-oxo-4-(2-palmitamidoetossi)but-2-enoico (3) – acido 2-[(2-palmitamidoetossi)carbonil] benzoico (4)</i>	38
	<i>3.1.4 Sintesi di dietilenglicol-2-palmitamidoetil succinato (5) – trietilenglicol-2-palmitamidoetil succinato (6) – tetraetilenglicol-2-palmitamidoetil succinato (7) – dietilenglicol-2-palmitamidoetil ftalato (8) – dietilenglicol-2-palmitamidoetil (E)-fumarato (9)</i>	39
	<i>3.1.5 Sintesi del 2-(2-metossietossi)etil-2-palmitamidoetil succinato (10)</i>	39
	<i>3.1.6 Sintesi del dietilenglicol-2-palmitamidoetil carbonato (11)</i>	40
	<i>3.2 Sintesi e caratterizzazione dei co-drug di PEA</i>	42
	<i>3.2.1 Sintesi del 2-pamitamidoetil butirrato (12)</i>	43
		108

Capitoli	Sottocapitoli	Pagine
	<i>3.2.2 Sintesi dell'acido (E)-12-oxo-12-(2-palmitamidoetossi)dodec-10-enoico (13)</i>	43
	<i>3.2.3 Sintesi del (1S, 3S, 4R)-4-isopropil-3-metilcicloesil-2-palmitamidoetil succinato (14)</i>	44
	<i>3.3 Preparazione delle NLC</i>	46
	<i>3.4 Caratterizzazione delle NLC</i>	48
	<i>3.4.1 Analisi dimensionale: Spettroscopia di fotocorrelazione</i>	48
	<i>3.4.2 Potenziale Zeta: Elettrophoretic Light Scattering</i>	49
	<i>3.4.3 Analisi termocalorimetrica: Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)</i>	49
	<i>3.4.4 Analisi di microscopia elettronica di trasmissione (TEM)</i>	50
	<i>3.5 Studi di permeazione cutanea</i>	51
	<i>3.5.1 Permeazione cutanea in vitro</i>	51
	<i>3.5.2 Permeazione cutanea ex vivo</i>	52
	<i>3.6 Studi di stabilità dei profarmaci</i>	53
	<i>3.6.1 Studi di idrolisi chimica</i>	53
	<i>3.6.2 Studi computazionali di idrolisi enzimatica</i>	53
	<i>3.7 Analisi HPLC</i>	55
	<i>3.8 Farmacologia</i>	56
	<i>3.8.1 Esperimenti in vivo</i>	56
	<i>3.8.2 Esperimenti in vitro</i>	58
	<i>3.9 Analisi statistica</i>	59
<b>Capitolo 4: Risultati</b>		60
	<i>4.1 Profarmaci dermici</i>	60
	<i>4.1.1 Profarmaci dermici: efficacia farmacologica</i>	60
	<i>4.1.2 Profarmaci dermici: accumulo cutaneo</i>	62
	<i>4.1.3 Profarmaci dermici: studi di stabilità chimica ed enzimatica</i>	67
	<i>4.1.4 Profarmaci dermici: discussione</i>	70
	<i>4.2 NLC</i>	74
	<i>4.2.1 NLC: Analisi dimensionale e potenziale zeta</i>	74
	<i>4.2.2 NLC: Analisi termocalorimetrica e morfologica</i>	75
	<i>4.2.3 NLC: Permeazioni cutanee</i>	78
	<i>4.2.4 NLC: Saggi farmacologici</i>	81
	<i>4.2.5 NLC: Discussione</i>	82
	<i>4.3 Co-drugs: Risultati farmacologici</i>	85
<b>Capitolo 5: Conclusioni</b>		88
<b>Capitolo 6: Bibliografia</b>		92
<b>Capitolo 7: Indice</b>		108